



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – CLINEX

ANÁLISE MOLECULAR DO CARCINOMA PAPILÍFERO
DA TIREÓIDE E SUAS VARIANTES

Silvia de Oliveira Loiola

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental - CLINEX

**ANÁLISE MOLECULAR DO CARCINOMA PAPILÍFERO DA
TIREÓIDE E SUAS VARIANTES**

Silvia de Oliveira Loiola

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientadora:

Prof^ª Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo

Rio de Janeiro

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Loiola, Silvia de Oliveira

Análise Molecular do Carcinoma Papilífero da Tireóide e suas variantes / Silvia de Oliveira Loiola. -- Rio de Janeiro: UERJ / FCM, 2007.

xx, 135p.: il.; 30 cm.

Orientadora: Cláudia Vitória de Moura Gallo

Dissertação (mestrado) – UERJ / Faculdade de Ciências Médicas / Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, 2007.

Referências bibliográficas: f. 96-106

1. Câncer de tireóide. 2. Carcinoma papilífero da tireóide. 3. BRAF. 4. TP53. 5. Biologia Molecular de Tumores - Tese. I. de Moura Gallo, Cláudia Vitória. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. III. Título.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CENTRO BIOMÉDICO

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental - CLINEX

**ANÁLISE MOLECULAR DO CARCINOMA PAPILÍFERO
DA TIREÓIDE E SUAS VARIANTES**

Silvia de Oliveira Loiola

Orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Vitória de Moura Gallo

Aprovada em ____ de _____ de 2007 pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Rio de Janeiro

2007

A Deus...porque dEle, e por Ele, e para Ele são todas as coisas!

*Aos meus pais...que sempre se esforçaram pela minha
felicidade e me apoiaram em todas as minhas
escolhas; e a quem eu devo sempre honrar*

*Aos meus amigos...muitos
deles mais chegados
que irmãos.*

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Cláudia Vitória de Moura Gallo, por toda a confiança depositada em mim, me possibilitando crescer mais profissionalmente; além do carinho, paciência, acessibilidade, compreensão e serenidade demonstrada nos momentos mais difíceis.

- À Val, sempre disposta a se doar, me incentivar, socorrer, ensinar e, sobretudo por ter se revelado uma verdadeira amiga nos momentos que mais precisei... não dá para te agradecer só com essas linhas; à Pri, pela amizade, alegria e por sempre me incentivar a ver o lado positivo e possível das coisas... vc podia estar aqui, né? Mas mesmo de longe se sinta participante; a todas as meninas do grupo, companheiras de experimentos, e conversas, desabafos, choros e alegrias - Marina, Evelin, Luíza, Giselle e Claudinha, desejo muito sucesso em todas as escolhas.

- Ao Dr Basílio, que mesmo estando sempre muito atarefado, me deu todo o apoio para que realizasse esse trabalho, de diversas maneiras. E também a toda a sua equipe no Gaffrée, que sempre foi muito atenciosa comigo, principalmente Rodrigo, pela revisão de algumas lâminas e por sempre estar disposto a tirar minhas dúvidas; assim como a Beth e Antônio pelo processamento de diversas lâminas histológicas.

- Ao pesquisador Júlio Paixão por sempre se mostrar disponível em ajudar com seus conselhos científicos e recursos técnicos.

- Aos colegas do DBCG - técnico-administrativos, professores e alunos por todo o suporte para que esse trabalho pudesse ser realizado; principalmente Ceiça (pelo apoio moral...), Carol, Chico, Gisele, Denise, Ângela, Carla, Ulisses, Marly e tantos outros, que se mostraram mais que colegas, obrigada pelo carinho, interesse, amizade, conversas descontraídas e pelas risadas.

- Aos professores que aceitaram fazer parte da banca, como titulares ou suplentes, e principalmente à professora Maria da Conceição, por também ter sido a revisora crítica desta dissertação.
- Aos professores e equipe da Pós-Graduação, por participarem dessa etapa da minha formação acadêmica, principalmente à Amélia, pela competência profissional e ajuda.atenção.
- Ao amigo Waldoniê, que me acompanhou no perigoso trajeto noturno até o metrô quando os dias se tornaram pequenos...
- A todos os meus amigos, que se preocuparam comigo, me ajudaram com suas orações e principalmente aos da IPVP, que em muitos momentos supriram a minha ausência durante o período de elaboração desse trabalho. Si, a nossa “arte” ficou linda...Cíntia e Adê, mais uma vez sem palavras para agradecer o companheirismo e amizade de vocês.
- Ao Vicente, pela disponibilidade em conseguir os artigos e principalmente pelo carinho...
- Ao pessoal do HUPE – Endócrino, Cirurgia e principalmente aos pacientes com câncer de tireóide que colaboraram para a realização deste trabalho.
- A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Taxas de incidência e de mortalidade (valores por 10⁵ pessoas) do câncer de tireóide no Brasil, ajustadas por idade, segundo município de referência e gênero. **Pág.: 5**

TABELA 2 - Algumas variantes do Carcinoma Papilífero - classificação de acordo com o prognóstico em relação ao PTC clássico. **Pág.: 19**

TABELA 3 – Algumas alterações moleculares observadas nas neoplasias da tireóide. **Pág.: 28**

TABELA 4 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação (PCR) para a identificação de mutações nos exons 5 a 8 do gene *TP53*. **Pág.: 64**

TABELA 5 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação (PCR) para a identificação de mutações no exon 15 do gene *BRAF*. **Pág.: 65**

TABELA 6 - Resumo das características fisiopatológicas dos casos estudados, com características dos pacientes e dos tumores. **Pág.: 76**

TABELA 7 - Resultados da análise da mutação T1799A no gene *BRAF* e da presença dos rearranjos *RET/PTC1* e *RET/PTC3*. **Pág.: 78**

TABELA 8 - Resultados da análise da expressão da proteína p53 por imunohistoquímica. **Pág.: 82**

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Taxas de incidência do câncer de tireóide (por 10^5 pessoas) para homens e mulheres, ajustadas por idade, ao redor do mundo. **Pág.: 2**
- FIGURA 2** - Distribuição dos cânceres primários ocorridos nos Estados Unidos, por gênero, na faixa de 15-29 anos de idade, de 1975–2000. **Pág.: 4**
- FIGURA 3** - Esquema representativo das células C e células foliculares da tireóide e seus produtos hormonais. **Pág.: 14**
- FIGURA 4** - Esquema representativo do modelo de carcinogênese em múltiplos passos nas neoplasias da tireóide. **Pág.: 32**
- FIGURA 5** - Esquema representativo das vias de sinalização envolvidas nas neoplasias da célula folicular da tireóide. **Pág.: 34**
- FIGURA 6** - Esquema representativo da estrutura da proteína RET. **Pág.: 36**
- FIGURA 7** - Esquema representativo da ativação do receptor RET. **Pág.: 40**
- FIGURA 8** - Esquema representativo da organização das proteínas RAF quinases. **Pág.: 44**
- FIGURA 9** - Esquema da organização da proteína p53, com as 5 regiões estruturais e funcionais. **Pág.: 49**

FIGURA 10 - Esquema mostrando classes de sinais de estresse celular que induzem à ativação da p53 por fosforilação e os efeitos supressores de tumor desencadeados, além da regulação da p53 por MDM2 e outras proteínas inibitórias da p53. **Pág.: 51**

FIGURA 11 - Perfil de distribuição dos pacientes estudados por diagnóstico histológico.

Pág.: 71

FIGURA 12 - Fotomicrografias de tumores analisados neste trabalho, corados com hematoxilina-eosina, representando cada tipo histológico. **Pág.: 73**

FIGURA 13 - Perfil de distribuição dos pacientes estudados por gênero, no total de casos e para cada tipo histológico. **Pág.: 74**

FIGURA 14A - Imagem representativa da análise do exon 15 do gene *BRAF* por PCR-SSCP em gel de acrilamida 8%. **Pág.: 79**

FIGURA 14B - Imagem de eletroferograma mostrando a presença da mutação T1799A em um dos alelos do tumor T5. **Pág.: 79**

FIGURA 15 - Fotomicrografia do tumor 14A, da variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero (PTCVED) corado por imunohistoquímica para a proteína p53. **Pág.: 83**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

γ	gama
%	porcentagem
°C	graus Celsius
x g	unidade de medida da força centrífuga relativa
μg	micrograma
μL	microlitro
^{131}I	iodo radioativo
A1802G	transição de guanina para adenina no nucleotídeo 1802 do gene <i>BRAF</i>
A ₂₆₀	absorbância a 260 nanômetros
A ₂₈₀	absorbância a 280 nanômetros
<i>AKAP9/BRAF</i>	fusão dos genes <i>BRAF</i> e <i>AKAP9</i>
AMPc	AMP cíclico (adenosina monofosfato cíclico)
A-RAF	isoforma A da proteína RAF
ATC	carcinoma anaplásico da tireóide
ATP	adenosina trifosfato
B-RAF	isoforma B da proteína RAF
<i>BRAF</i>	homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino v-raf
<i>BRAF</i> ^{V600E}	substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600 da
<i>BRAF</i> ^{K601E}	substituição do aminoácido lisina por ácido glutâmico no códon 601 da
<i>BRAF</i> ^{VK600-1E}	substituição dos aminoácidos valina e lisina por ácido glutâmico nos códons 600 e 601 da proteína <i>BRAF</i>
CDKs	quinases dependentes de ciclinas
cm	centímetro
CpG	dinucleotídeos de citosina e guanina unidos por ligação fosfodiéster
CR1	domínio rico em cisteína da região da proteína RAF
CR2	domínio rico em serina e treonina da região da proteína RAF
CR3	domínio quinase da região da proteína RAF
C-RAF	isoforma C da proteína RAF
D.O.	densidade ótica
D1	ciclina D1
DG	Doença de Graves
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato

E1	ciclina E1
E3 - ligases	proteínas ligadoras de ubiquitina
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EGF	fator de crescimento epidérmico
ER- α	receptor de estrogênio α
ER- β	receptor de estrogênio β
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FTC	carcinoma folicular da tireóide
G1	fase G1 do ciclo celular
G2	fase G2 do ciclo celular
G464-V471	aminoácidos glicina do códon 464 e valina do códon 471 da proteína BRAF
G596-V600	aminoácidos glicina do códon 596 e valina do códon 600 da proteína BRAF
GDP	guanosina difosfato
GFRA-1 e GFRA 2	co-receptores para GDNF
<i>GNAS₁</i>	gene da subunidade α da proteína G estimulatória
GDNF	fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia
Gs	proteína G estimulatória
Gs- α	subunidade α da proteína G estimulatória
GTP	guanosina trifosfato
GTPase	guanosina trifosfatase
<i>Ha-RAS</i>	proto-oncogene da família RAS
HDM2	proteína HDM2 (do inglês <i>human double minute 2</i>)
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUGG	Hospital Universitário Gaffrée e Güinle
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KDa	quilodalton
<i>Ki-RAS</i>	proto-oncogene da família RAS
LOH	perda de heterozigose
MAPK	via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos
MDM2	proteína MDM2 (do inglês <i>murine double minute 2</i>)
MEK	MAPK/ERK quinase
MEN2A	síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas do tipo 2A
MEN2B	síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas do tipo 2B

mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNAs	ácidos ribonucléicos mensageiros
MS	Ministério da Saúde
MTC	carcinoma medular da tireóide
ng	nanograma
NIS	proteína simportadora de iodeto e sódio (do inglês <i>sodium iodide symporter</i>)
nm	nanômetro
NMTC	tumores não-medulares da tireóide
<i>N-RAS</i>	proto-oncogene da família RAS
NTKR	receptor tirosina-quinase neurotrófico
P.A	para análise
p53	fosfoproteína supressora de tumor
PAAF	punção aspirativa com agulha fina
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PDTIS/FIOCRUZ	Plataforma de Bioinformática da Fundação Oswaldo Cruz
pH	potencial hidrogeniônico
PI3K	fosfatidil-inositol-3 quinase
PKA	proteína quinase A dependente de AMPc
pmols	picomoles
PP2A	fosfatase 2A
PTC	carcinoma papilífero da tireóide
PTCc	carcinoma papilífero da tireóide clássico
PTCVED	carcinoma papilífero da tireóide – variante esclerosante difusa
PTCVF	carcinoma papilífero da tireóide – variante folicular
r.p.m	rotações por minuto
RAF	proteína RAF
RAF1	isoforma C da proteína RAF
RAS	proteína RAS
RAS-GTP	proteína RAS ligada a molécula de guanosina trifosfato
RB	retinoblastoma

RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional
<i>RET</i>	gene do receptor para fator de crescimento neurotrófico derivado de célula
<i>RET/PTC</i>	rearranjos do gene <i>RET</i> com genes heterólogos
<i>RET/PTC₁</i>	rearranjo formado pela fusão dos genes <i>H4</i> ou <i>D10S170</i> com o gene <i>RET</i>
<i>RET/PTC3</i>	rearranjo formado pela fusão dos genes <i>RFG</i> ou <i>ELE1</i> com o gene <i>RET</i>
RTK	receptor tirosina-quinase
RT-PCR	transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase
S	fase do ciclo celular
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDSK	dodecil sulfato de sódio e proteinase K
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
T1799A	transversão de timina para adenina no nucleotídeo 1799 do gene <i>BRAF</i>
T3	hormônio tireoideano L-triiodotironina
T4	hormônio tireoideano L-tiroxina
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TATA	seqüência de nucleotídeos rica em T e A na região promotora dos genes
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TBP	proteína de ligação ao TATA box
TE	tampão tris-EDTA
TEMED	N' N' N' N'-Tetrametiletilenodiamina
TGA1799-1801	deleção dos nucleotídeos timina, guanina e adenina nos nucleotídeo 1799-1801 do gene <i>BRAF</i>
TK	tirosina-quinase
<i>TP53</i>	gene <i>TP53</i>
<i>TP63</i>	gene da proteína p63
<i>TP73</i>	gene <i>TP73</i>
TRAb	anticorpos anti-receptores do TSH
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
tris	trihidroxi-metil-amino-metano
TSH	hormônio estimulante da tireóide
<i>TSHR</i>	gene do receptor de TSH
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	unidade
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
UV	radiação ultravioleta
V	volts
v/v	volume por volume
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
<i>I- INTRODUÇÃO</i>	1
<u>1 - EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE TIREÓIDE</u>	1
1.1 – CÂNCER DE TIREÓIDE NO MUNDO	1
1.2 – CÂNCER DE TIREÓIDE NO BRASIL	4
<u>2 - FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE TIREÓIDE</u>	7
2.1 - RADIAÇÃO IONIZANTE	8
2.2 - HISTÓRIA PESSOAL BENIGNA DE BÓCIO E NÓDULO	109
2.3 - GÊNERO, IDADE E HORMÔNIOS SEXUAIS	10
2.4 - HISTÓRIA FAMILIAR	11
2.5 - OUTROS FATORES DE RISCO	12
<u>3 - OS TIPOS DE TUMORES DA TIREÓIDE</u>	13
3.1 - TUMORES DAS CÉLULAS EPITELIAIS FOLICULARES	15
3.1.1 – TUMORES BENIGNOS	15
3.1.2 – TUMORES MALIGNOS	16
3.1.2.1 – Tumores malignos bem-diferenciados	16
3.1.2.2 – Tumores malignos indiferenciados	23
3.2 – TUMORES DAS CÉLULAS C-PARAFOLICULARES	25
<u>4 – ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CÂNCER DE TIREÓIDE</u>	26
4.1 – PROTO-ONCOGENES E OS TUMORES DA TIREÓIDE	32
4.1.1 – A VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK (<i>MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE</i>)	34
4.1.1.1 – O gene <i>RET</i> e seu produto	36
4.1.1.2 – O gene <i>RAS</i> e seu produto	41
4.1.1.3 – O gene <i>BRAF</i> e seu produto	42

4.2 – GENES SUPRESSORES DE TUMOR E OS TUMORES DA TIREÓIDE	47
4.2.1 – O GENE <i>TP53</i> E SEU PRODUTO	49
II - OBJETIVOS	56
III - MATERIAL E MÉTODOS	58
1 - <u>MATERIAL</u>	58
1.1 – TUMORES DE TIREÓIDE	58
2 - <u>MÉTODOS</u>	59
2.1 – EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO	59
2.1.1 – EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO TIREOIDEANO FRESCO	59
2.1.2 – EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO TIREOIDEANO ARQUIVADO	60
2.2 – QUANTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO	61
2.3 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION – PCR</i>)	62
2.3.1 - AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS 5, 6, 7 E 8 DO GENE <i>TP53</i>	62
2.3.2 - AMPLIFICAÇÃO DO EXON 15 DO GENE <i>BRAF</i>	63
2.4 – VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO	65
2.5 – POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES (<i>SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM – SSCP</i>) DOS EXONS 5-8 DO GENE <i>TP53</i> E DO EXON 15 DO GENE <i>BRAF</i>	66
2.6 – COLORAÇÃO PELA PRATA	67
2.7 - SEQÜENCIAMENTO	67
2.7.1 - PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR	67
2.7.2 - REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO	69
2.8 – IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53	69
IV- RESULTADOS	71
1 – <u>CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES ESTUDADOS</u>	71
2 – <u>ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE TP53</u>	77
3 – <u>ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53</u>	79

4 - <u>ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE BRAF</u>	80
5 - <u>ANÁLISE DOS REARRANJOS RET/PTC₁ E RET/PTC₃</u>	81
V - DISCUSSÃO	84
VI - CONCLUSÕES	97
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	109
ANEXO 1 - Artigo em Preparação	109
ANEXO 2 - Artigo em Preparação	121
ANEXO 3 – Lista de reagentes	135

RESUMO

Os carcinomas de tireóide são as neoplasias malignas mais frequentes do sistema endócrino, e um dos poucos cânceres cuja incidência tem aumentado. Mais de 95% dos carcinomas da tireóide derivam das células foliculares e são divididos em carcinomas papilíferos (PTC), carcinomas foliculares (FTC) e carcinomas anaplásicos (ATC), com base em parâmetros clínicos e histológicos, e constituem um modelo interessante para a compreensão de eventos genéticos envolvidos na carcinogênese em múltiplos passos na tireóide. O PTC é o tipo de carcinoma da tireóide mais comum, representando cerca de 80% dos casos, e o ATC é considerado o mais agressivo, ocorrendo em aproximadamente 2% dos casos. A maioria dos carcinomas originados das células foliculares são bem-diferenciados, de comportamento indolente. Entretanto, alguns desses tumores evoluem para uma forma mais agressiva.

Alterações no gene supressor de tumor *TP53* e acúmulo nuclear da proteína p53 inativa estão associadas com as formas mais agressivas e pouco diferenciadas dos carcinomas da tireóide, indicando que no processo da tumorigênese tireoideana representam eventos tardios. A mutação T1799A no exon 15 do gene *BRAF*, resultando na substituição do aminoácido valina para ácido glutâmico (V600E) e causando ativação constitutiva da *BRAF* quinase ocorre no PTC e em carcinomas derivados desse. A frequência dessa mutação no PTC varia de 29-83%. Os rearranjos do receptor tirosina-quinase RET (*RET/PTC*) surgem pela fusão do domínio tirosina-quinase do gene *RET* com porções 5' de genes heterólogos, havendo então a síntese de oncoproteínas quiméricas com a função tirosina-quinase constitutivamente ativada, sendo *RET/PTC₁* e *RET/PTC₃* as formas mais frequentes. As alterações genéticas dos genes *RET* e *BRAF* resultam na ativação constitutiva da via das MAP quinases, levando à tumorigênese. Análises de mutações em *BRAF* e dos rearranjos *RET/PTC* têm se mostrado importantes ferramentas no diagnóstico das neoplasias tireoideanas.

Para melhor compreensão da carcinogênese molecular tireoideana foi analisada a presença da mutação T1799A no gene *BRAF* em carcinomas da tireóide, incluindo os casos de PTC e ATC. Também foi estudada a presença de mutações no gene *TP53* e a expressão da proteína p53 na rara variante esclerosante difusa do PTC e no ATC.

Fragmentos de carcinomas da tireóide de 33 pacientes do HUPE (Hospital Universitário Pedro Ernesto), HUGG (Hospital Universitário Gaffrée e Günle), HUCFF (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho) e do Hospital das Clínicas da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas) foram obtidos de biopsias cirúrgicas. Os carcinomas analisados foram 5 casos de ATC, 3 casos da variante folicular do PTC, 18 de PTC clássico e 7 da variante esclerosante difusa do PTC.

A mutação T1799A no gene *BRAF* foi identificada em 9 casos (7 PTC clássicos e 2 var. esclerosantes difusas do PTC), representando uma frequência de 32,1% nos carcinomas papilíferos, incluindo suas variantes e indicando a participação do proto-oncogene *BRAF* na etiologia do PTC. A presença simultânea da mutação T1799A de *BRAF* e de rearranjos *RET/PTC* foi observada em dois carcinomas papilíferos anteriormente analisados quanto à expressão desses rearranjos. Tal ativação oncogênica ocorrendo em dois efetores da via MAP quinase parece conferir a esses carcinomas um maior potencial de agressividade. Não foram encontradas mutações nos exons 5-8 do gene *TP53* entre os carcinomas anaplásicos e papilíferos da variante esclerosante difusa analisados, porém a proteína p53 apresentou uma expressão aumentada em 75% dos carcinomas anaplásicos e em 28,6% dos carcinomas da variante esclerosante difusa. Esse acúmulo da proteína p53 é devido possivelmente a outros mecanismos diferentes da presença de mutação.

ABSTRACT

Thyroid cancers are the most frequent endocrine malignancies, being one of the few that are increasing in incidence. More than 95% of thyroid carcinomas derive from follicular cells and are divided into papillary (PTC), follicular (FTC) and anaplastic carcinomas (ATC) on the basis of histological and clinical parameters. These types of cancer are models for studying the molecular genetics of multistep carcinogenesis in the thyroid. Important genetic alterations are related with the histological classification of thyroid tumors. Among them is the *BRAF*^{V600E} mutation and *RET* rearrangements, which correlate with PTC and the mutations in the tumor suppressor gene *TP53* that correlate to the anaplastic carcinoma. The T1799A mutation in the exon 15 of the *BRAF* gene that results in a valine to glutamate substitution (V600E) and causes constitutive activation of the BRAF kinase occurs in PTC and in papillary-derived anaplastic carcinoma. The frequency of this mutation ranges from 29 to 83% in PTCs. Rearrangements of the RET tyrosine kinase receptor (*RET/PTC*) arise as consequence of chromosomal recombinations, which drive the fusion of *RET* gene tyrosine kinase domain to the 5' sequences of heterologous genes. These rearrangements create chimeric oncoproteins with a constitutive active tyrosine kinase function and *RET/PTC*₁ and *RET/PTC*₃ are the most frequent forms of *RET/PTC* rearrangements. These genetic alterations result in a constitutive activation of the MAP kinase pathway, leading to tumorigenesis. Analysis of *BRAF* mutation and *RET/PTC* rearrangements have shown to be an important tool in the thyroid neoplasm diagnostic. In order to better understand the process of thyroid tumorigenesis in malignant tumors we studied the presence of *BRAF* T1799A mutation in thyroid tumors, including papillary and anaplastic carcinomas. We also studied the presence of *TP53* gene mutations and the p53 protein expression level in the rare diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma and in anaplastic carcinomas. Thyroid carcinomas of 33 patients from several hospitals (HUPE, HUGG, HUCFF and Hospital das Clínicas - UNICAMP) were obtained from surgical biopsies. The analyzed carcinomas were: 5 ATC, 3 follicular variant PTC, 18 classic PTC and 7 diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. The *BRAF* T1799A mutation was identified in 9 cases (7 classic PTC and 2 diffuse sclerosing variant-PTC), corresponding to a frequency of 32.1% in PTCs including its variants and indicates the role of *BRAF* gene in PTC etiology. Two PTC harbored simultaneously both the *RET/PTC* rearrangement and the T1799A *BRAF* mutation. These two oncogenic events in the MAPK pathway may confer more aggressiveness to these tumors. *TP53* mutations in exons 5 - 8 were not found in the analyzed carcinomas; however the p53 protein was over expressed in 75% of anaplastic carcinomas and in 28.6% of the diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. This p53 protein accumulation in the absence of a mutation in the analyzed exons suggests that the p53 activity may be inhibited in thyroid cancer by other mechanisms.

I – INTRODUÇÃO

1 - EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE TIREÓIDE

1.1 - CÂNCER DE TIREÓIDE NO MUNDO

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina maligna mais freqüente (Weber *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006; Salvatore *et al.*, 2006), apresentando o maior índice de mortalidade entre essas doenças (Le & Norton, 2000). Este tipo de câncer representa cerca de 1% de todos os cânceres humanos e apresenta heterogeneidade em termos histológicos, na apresentação clínica e prognóstico (Puxeddu *et al.*, 2004; Smalyte *et al.*, 2006; Borges, 2006).

A prevalência de nódulos tireoideanos clinicamente palpáveis, que constituem, na maioria dos casos, a forma de apresentação inicial do câncer de tireóide (Salvatore *et al.*, 2004; Quiros *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005, Xing *et al.*, 2004), é de 2–7% na população normal adulta. Com o uso da ultrassonografia e de outras técnicas sensíveis de imagem, chega-se a detectar nódulos palpáveis e não-palpáveis em 50% nessa mesma população, mas apenas 5-10% do total dos nódulos encontrados são malignos (Coeli *et al.*, 2005; Keat, 2007).

O projeto GLOBOCAN estimou para o ano de 2002 a ocorrência no mundo de 141.013 casos novos de câncer de tireóide e de 35.575 óbitos por essa causa. Estes números correspondem a estimativas da taxa de incidência do câncer de tireóide ajustada para idade, em mulheres, de $5,5/10^5$ nas regiões desenvolvidas (inclui, por exemplo, América do Norte e Europa) e de $2,6/10^5$ nas regiões menos desenvolvidas (inclui, por exemplo, África e América do Sul). Para homens as estimativas foram de $2,1/10^5$ e de $1,0/10^5$ (Coeli *et al.*, 2005) em regiões desenvolvidas e menos desenvolvidas, respectivamente. De acordo com essas estimativas, a taxa de incidência do câncer de tireóide, ajustada por idade, por gênero e

localização global encontra-se mais alta na América do Norte, e apresenta-se baixa em todas as partes da África (**FIGURA 1**).

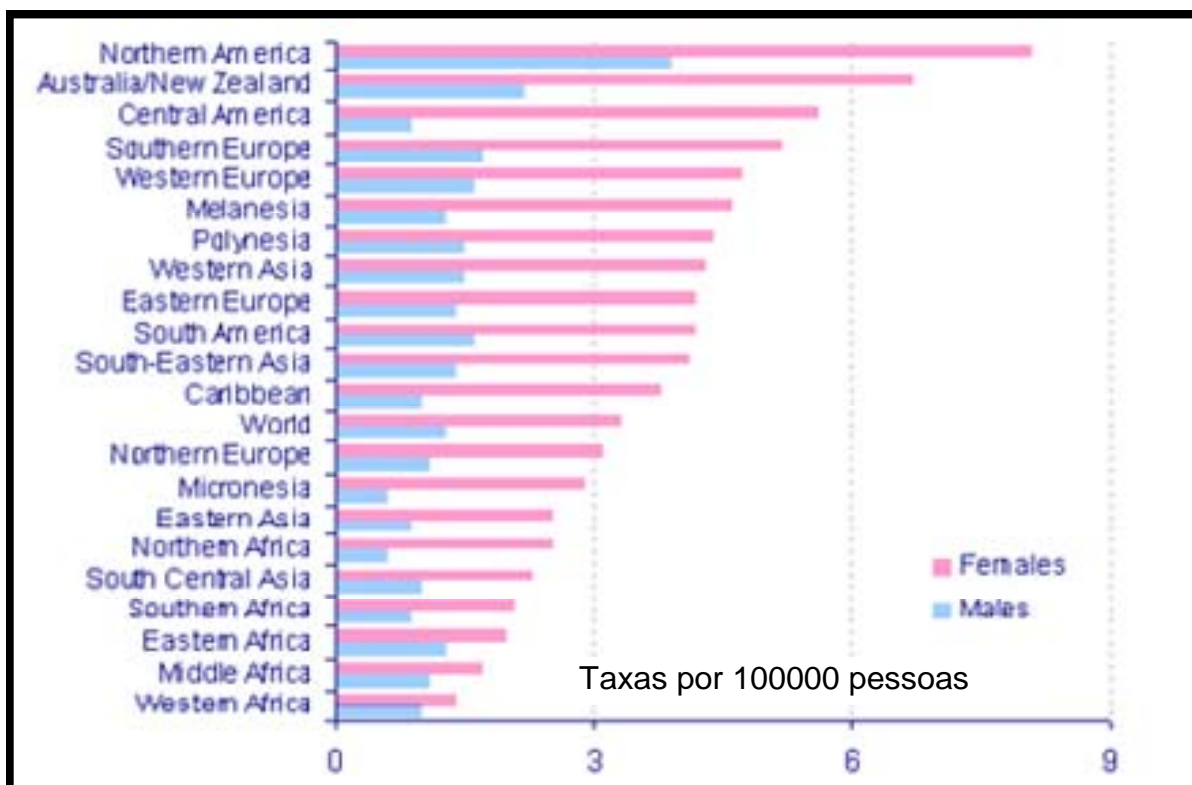


FIGURA 1 - Taxas de incidência do câncer de tireóide (por 10^5 pessoas) para homens e mulheres, ajustadas por idade, ao redor do mundo.

(Fonte: modificado de <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/thyroid/incidence/#sex>).

As taxas de incidência ajustadas por idade variam consideravelmente entre populações de diversas localizações geográficas ao redor do mundo, em sua maioria situando-se entre $0,5-10/10^5$. Em algumas localidades, porém, altas taxas de incidência têm sido encontradas, como na Islândia, Havaí e Israel ($8,5-19,4/10^5$) (Kondo *et al.*, 2006).

Apesar de ser considerado uma doença relativamente rara, o câncer de tireóide é uma das poucas doenças malignas cuja incidência tem aumentado nas últimas décadas, principalmente nos países desenvolvidos, sem que haja uma causa claramente conhecida para este aumento (Mack *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2003; Zabel *et al.*, 2006). Tal fato pode ser um

reflexo de um aumento de riscos ambientais e/ou de eficiência diagnóstica para esses tumores, que passam a ser detectados mais precocemente (Smailyte *et al.*, 2006). Essa última hipótese tem sido a mais aceita, uma vez que ao diagnóstico tem-se verificado uma diminuição do tamanho dos tumores detectados e uma prevalência maior de tipos histológicos menos agressivos (Trimboli *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos a incidência anual aumentou cerca de 50% nos últimos 25 anos (Chiloeches & Marais, 2006).

Não se observa predominância do câncer de tireóide em relação a alguma etnia, mas entre os gêneros observa-se uma variação de incidência, de 3-4 vezes mais alta em mulheres, sendo que esse padrão é observado independentemente da localização geográfica (Schmutzler & Koehrlé, 2000; Egawa *et al.*, 2001; Sakoda & Horn-Ross, 2002).

Um padrão de incidência idade-específica também é encontrado, havendo maior incidência entre as mulheres jovens (25-50 anos), englobando 70% dos casos e sendo um dos cinco tipos de câncer mais comuns nesse grupo. Entretanto, essa incidência decresce após a menopausa e, após os 70 anos, observam-se incidências similares em ambos os gêneros (Egawa *et al.*, 2001; Mack *et al.*, 2002; Horn-Ross *et al.*, 2002; Wojciechowska & Lewinski, 2006).

Comparando-se a distribuição entre os gêneros, dos tipos de câncer mais frequentes nos Estados Unidos, na faixa de 15-29 anos de idade (**FIGURA 2**), observa-se que após os cânceres do trato genital, a diferença mais evidente é a frequência muito maior do câncer de tireóide em mulheres (Bleyer *et al.*, 2006).

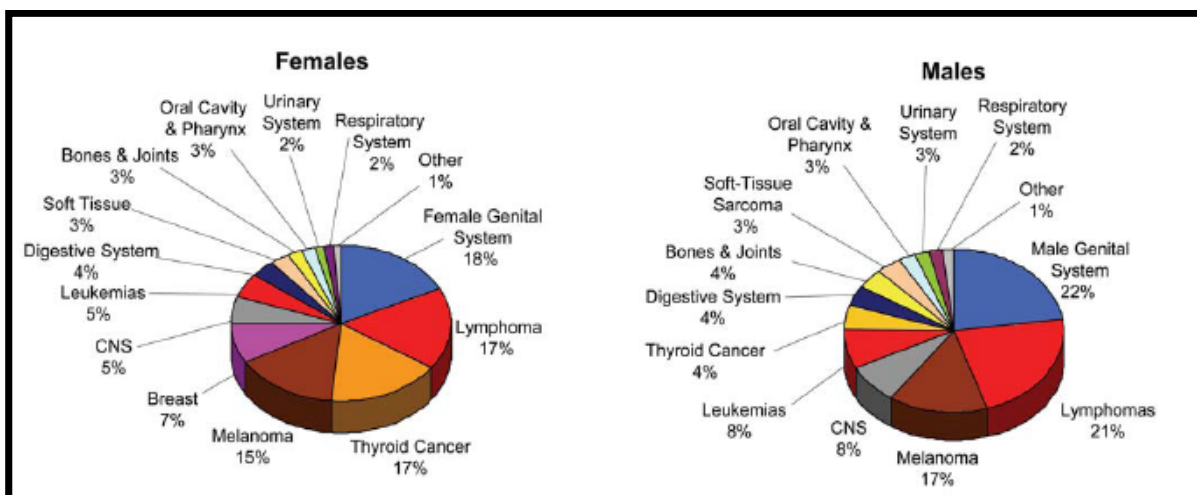


FIGURA 2 – Distribuição dos cânceres primários ocorridos nos Estados Unidos, por gênero, na faixa de 15-29 anos de idade, de 1975–2000 (Fonte: Bleyer *et al.*, 2006).

Apesar do crescimento da taxa de incidência do câncer de tireóide, principalmente em mulheres, as taxas de mortalidade permanecem baixas e têm sofrido uma diminuição nos últimos anos (Trimboli *et al.*, 2006), não estando incluídas entre as maiores taxas de mortalidade por câncer, em ambos os gêneros. O projeto GLOBOCAN estimou, para o ano de 2002, taxas de mortalidade ajustadas por idade no sexo feminino de $0,5/10^5$ nas regiões mais desenvolvidas e de $0,8/10^5$ nas regiões menos desenvolvidas. A estimativa da taxa de mortalidade na população masculina foi a mesma nas duas regiões, sendo igual a $0,4/10^5$ (Coeli *et al.*, 2005). Isso significa que, para cada 100 pacientes diagnosticados com câncer de tireóide, 14 pacientes morrem, enquanto para os cânceres de pulmão e cólon, por exemplo, cerca de 90% e 60% dos pacientes morrem, respectivamente (Keat, 2007).

1.2 - CÂNCER DE TIREÓIDE NO BRASIL

No Brasil, o câncer de tireóide correspondeu a 1,3% de todos os casos de câncer matriculados no Instituto do Câncer (Ministério da Saúde-INCA) de 1994 a 1998, e a 6,4% de todos os cânceres da cabeça e pescoço, neste mesmo período (MS/INCA, 2006).

A incidência do câncer da tireóide no Brasil se assemelha à descrita em outros países, embora varie consideravelmente entre as diversas localidades brasileiras pesquisadas. Alguns locais apresentam valores que se aproximam aos verificados no projeto GLOBOCAN para as regiões desenvolvidas (São Paulo, Goiânia, Distrito Federal), enquanto outros apresentam valores que se aproximam daqueles verificados para regiões menos desenvolvidas (Belém, Recife, Salvador e Porto Alegre). Ao se observar, nos últimos anos, as taxas de incidência ajustadas por idade, em homens, observa-se uma variação de $0,7/10^5$ em Belém até $3,0/10^5$ em São Paulo (razão = 4,3). Essas cidades também apresentaram, respectivamente, a mais baixa ($0,8/10^5$) e a mais alta ($10,9/10^5$) taxas de incidência ajustadas por idade entre as mulheres (Coeli *et al.*, 2005) (TABELA 1).

TABELA 1 - Taxas de incidência e de mortalidade (valores por 10^5 pessoas) do câncer de tireóide no Brasil, ajustadas por idade, segundo município de referência e gênero (Fonte: Modificado de Coeli *et al.*, 2005).

Taxas de incidência e mortalidade por câncer da glândula tireóide segundo município de residência e sexo.									
		Incidência*				Mortalidade*			
		Taxa bruta	Taxa ajustada (1)	IC (95%)**		Taxa bruta	Taxa ajustada (1)	IC (95%)**	
				L. Inf.	L. Sup.			L. Inf.	L. Sup.
São Paulo, SP (1997-1998)									
	Homens	2,70	3,00	2,60	3,40	0,23	0,29	0,17	0,42
	Mulheres	11,40	10,90	10,30	11,60	0,49	0,55	0,39	0,70
Porto Alegre, RS (1993-1997)									
	Homens	0,90	1,10	0,70	1,50	0,23	0,27	0,07	0,47
	Mulheres	3,00	2,70	2,20	3,30	0,29	0,27	0,10	0,43
Recife, PE (1995-1998)									
	Homens	0,90	1,20	0,70	1,70	0,48	0,68	0,29	1,07
	Mulheres	3,50	3,50	2,80	4,20	0,55	0,62	0,32	0,92
Belém, PA (1996-1998)									
	Homens	0,40	0,70	0,20	1,30	0,18	0,29	0,00	0,65
	Mulheres	0,70	0,80	0,30	1,30	0,55	0,75	0,28	1,23
Goiânia, GO (1996-2000)									
	Homens	1,70	1,80	1,20	2,40	0,20	0,25	0,02	0,49
	Mulheres	6,50	7,20	6,10	8,30	0,66	1,06	0,57	1,55
Distrito Federal, DF (1996-1998)									
	Homens	1,70	2,90	2,00	3,80	0,30	0,49	0,12	0,86
	Mulheres	6,20	8,10	6,80	9,30	0,55	0,98	0,48	1,48
Salvador, BA (1997-2001)									
	Homens	0,70	1,00	0,70	1,30	0,17	0,32	0,11	0,54
	Mulheres	3,70	4,20	3,60	4,70	0,51	0,75	0,48	1,01

(*) Valores por 100.000; (**) Intervalo de confiança (95%) da taxa ajustada; (1) População Padrão Mundial

Deve-se considerar o fato de que a incidência do câncer de tireóide no Brasil não é desprezível e tem crescido, seguindo uma tendência de elevação que tem sido reconhecida em várias partes do mundo e tem se mantido nas últimas décadas, principalmente nos países desenvolvidos (Ward, 2005).

As taxas de mortalidade, no Brasil, vêm diminuindo ao longo dos anos e também são comparáveis às taxas de outros países. Verificam-se valores mais elevados para as mulheres em relação aos homens, e um crescimento a partir da faixa etária de 30 a 39 anos no período compreendido entre 1980 e 2001. Observa-se também que há uma grande variabilidade para as taxas de mortalidade ajustadas para a idade entre as localidades com Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) avaliadas (**TABELA 1**). Os maiores valores no grupo dos homens são observados em Recife ($0,68/10^5$ habitantes), enquanto Goiânia apresentou a maior taxa de mortalidade ajustada por idade no grupo das mulheres ($1,06/10^5$ habitantes) (Coeli *et al.*, 2005).

No Brasil, as tendências de queda de mortalidade e de aumento de incidência do câncer de tireóide nas últimas décadas, a exemplo do que se verifica em todo o mundo, são provavelmente explicadas pela maior disponibilidade e avanços tecnológicos de recursos médicos, representados principalmente pela ampla utilização de exames ultrassonográficos e de citologias em material obtido de nódulos tireoideanos por punção aspirativa com agulha fina (PAAF). Tais recursos possibilitam um aumento da capacidade de triagem e detecção mais precoce de tumores menos agressivos, monitoramento mais eficaz de condições tireoideanas benignas e malignas, com maior chance de tratamento rápido das recidivas e metástases, o que resulta em um aumento da sobrevida dos casos (Coeli *et al.*, 2005; Ward, 2005).

As variações geográficas de incidência e de mortalidade também estão relacionadas com a diferença de disponibilidade de recursos de diagnóstico e tratamento nas diferentes

regiões, além da qualidade dos dados dos registros de câncer. No caso específico do Brasil, o aparecimento das maiores taxas de incidência justamente nos RCBP com melhores indicadores de qualidade (São Paulo, Distrito Federal e Goiânia) indica que a qualidade da coleta de dados provavelmente exerceu influência na observação de incidências maiores, assim como na variação geográfica observada (Coeli *et al.*, 2005; Ward, 2005).

Poucos estudos têm sido publicados sobre a epidemiologia do câncer de tireóide em relação à população brasileira. Grandes limitações nacionais existem, ao ponto de apenas os registros de São Paulo e de Goiânia preencherem os critérios mínimos para serem considerados de cobertura adequada dos casos de câncer (Coeli *et al.*, 2005). Porém, esforços no sentido da inserção dos dados brasileiros de incidência e de mortalidade na epidemiologia mundial do câncer de tireóide, assim como a investigação de possíveis causas, permitindo comparações com outras nações e sugerindo ações estratégicas para o nosso país, são de relevante importância.

2 - FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE TIREÓIDE

Os fatores de risco para o câncer de tireóide podem ser de natureza biológica, podem estar relacionados ao ambiente ou podem ter um caráter genético. A exposição à radiação ionizante na região da cabeça e pescoço, a história pessoal de bócio ou nódulos tireoideanos benignos, história familiar de doença tireoideana, além de pertencer ao sexo feminino e estar em idade reprodutiva, são fatores identificados como positivamente associados ao câncer de tireóide, enquanto outros ainda estão sob investigação (Negri *et al.*, 1999; Horn-Ross *et al.*, 2001; Smailyte *et al.*, 2006; Zabel *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006).

2.1 - RADIAÇÃO IONIZANTE

A exposição à radiação ionizante na região de cabeça e pescoço, especialmente na infância, permanece como o único fator exógeno claramente associado com o aparecimento de tumores benignos e malignos da tireóide, quase exclusivamente tumores papilíferos (PTC) (Gimm, 2001; Coeli *et al.*, 2005).

A exposição à radiação ionizante externa com fins diagnósticos ou terapêuticos, particularmente durante a infância ou adolescência, para condições benignas de cabeça e pescoço, está associada a um risco aumentado de desenvolvimento do câncer de tireóide (Bucci *et al.*, 2001). Entre as décadas de 1920 e 1950, antes dos médicos saberem o perigo dos raios X, a radioterapia foi freqüentemente utilizada no tratamento de adenóides, hipertrofia de amígdalas, adenite cervical, mastoidite, sinusite, hemangioma, *tinea capitis*, e acne. Observou-se, então, forte relação entre o desenvolvimento do câncer de tireóide e história de irradiação de cabeça e pescoço, com período de latência de cinco anos ou mais. Estudos posteriores mostraram que a exposição à radiação em adultos (> vinte anos) também predisponha ao câncer de tireóide, havendo um maior período de latência entre a exposição e o desenvolvimento do câncer, em relação ao período observado para as crianças e adolescentes (Fincham *et al.*, 2000). Porém, os riscos decorrentes da exposição de adultos ainda não estão bem estabelecidos (Zabel *et al.*, 2006).

O tratamento com iodo radioativo (^{131}I), utilizado no hipertireoidismo, não está claramente associado com o aumento da incidência do câncer de tireóide e, por outro lado, pode até mesmo erradicar pequenos carcinomas ocultos, considerando-se a alta dose de radiação liberada na glândula. Alguns estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar essa questão, mas os resultados têm se mostrado contrastantes entre as séries de casos analisados (Peixoto *et al.*, 2003).

Também se observa um aumento da taxa de incidência do câncer de tireóide, principalmente do tipo histológico papilífero em eventos de poluição ambiental nos quais ocorre exposição da população à radiação de partículas nucleares. Exemplos dessa associação podem ser vistos nos episódios das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki (1945), nos testes nucleares realizados nas Ilhas Marshall (1954) e em Nevada (1951-1962) e no mais recente acidente nuclear, em Chernobyl, na Bielorrússia (1986). Em regiões altamente contaminadas pelo acidente de Chernobyl, onde a exposição ao iodo radioativo se deveu principalmente ao isótopo ^{131}I , encontra-se de cem a duzentas vezes aumentada a taxa de incidência do carcinoma papilífero, principalmente em crianças (Huang *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2006; Tronko *et al.*, 2006) e constata-se uma forte relação dose-resposta entre dose de radiação recebida na infância e o risco de desenvolver câncer de tireóide (Cardis *et al.*, 2005). Ainda não está claramente elucidado se a maior incidência ocorre em crianças porque sua tireóide é mais susceptível aos danos causados pela radiação ou porque a exposição das crianças à radiação é maior devido ao maior consumo do leite contaminado no evento radioativo ou ainda se ambas as hipóteses colaboram entre si (Kondo *et al.*, 2006). Evidências experimentais *in vivo* e *in vitro* mostram que a radiação ionizante transforma principalmente folículos tireoideanos em crescimento, explicando a maior incidência do câncer de tireóide em crianças e jovens expostos à radiação, em relação à população adulta (Ward, 2005).

É interessante perceber que tanto a deficiência de iodo quanto a suplementação deste parecem modificar o risco oferecido pelo ^{131}I , o que pode ter importantes implicações de saúde pública - a suplementação estável em populações deficientes de iodo pode reduzir substancialmente o risco do câncer de tireóide relacionado ao iodo radioativo em caso de exposição a este após acidentes radioativos ou durante procedimentos terapêuticos ou de diagnóstico (Cardis *et al.*, 2005).

2.2 - HISTÓRIA PESSOAL BENIGNA DE BÓCIO E NÓDULO

TIREOIDEANO

A presença de bócio, que se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia da célula tireoideana, tem sido relatada como um fator de risco para o carcinoma papilífero, assim como a presença de nódulos tireoideanos (Haselkorn *et al.*, 2003; Hemminki *et al.*, 2005). A maior taxa mitótica nas células tireoideanas, observada nessas condições, aumenta a chance de ocorrência de mutações e das células se replicarem antes de serem reparadas, o que pode elevar o risco para o câncer.

O risco do câncer de tireóide em um paciente com bócio ou nódulos varia de acordo com a idade, gênero e ingesta de iodo, mas não em relação à presença de uninodularidade ou multinodularidade. Os nódulos hipofuncionantes (frios - incorporam pouco ou nenhum iodo) na síntese de hormônios tireoideanos apresentam maior risco que nódulos normo - ou hiperfuncionantes (Belfiore *et al.*, 1992).

2.3 - GÊNERO, IDADE E HORMÔNIOS SEXUAIS.

A maioria dos cânceres de tireóide manifesta-se em pacientes em idade reprodutiva, com 20-50 anos de idade, tendo sua incidência diminuída após a menopausa, e são cerca de três vezes mais frequentes em mulheres do que em homens. Esta distribuição de incidência em relação a gênero e idade indica que hormônios femininos podem estar envolvidos na etiologia e progressão do câncer de tireóide. Além disso, sabe-se que os receptores de estrogênio ER- α e ER- β são expressos nas células foliculares tireoideanas, e que o estrogênio atua como um fator de transcrição, promovendo a proliferação dessas células. As funções de ER- α e ER- β não são idênticas, pois ativam genes-alvo diferentes; mas podem formar heterodímeros, o que sugere uma interação entre suas vias. Especula-se que a expressão relativa desses receptores pode modular a ação do estrogênio. Já se observou correlação entre

expressão de ER- β e resistência a tamoxifeno em câncer de mama positivo para ER- α . Estudos também mostraram que há vários ER- β mRNAs e que o perfil de expressão dessas variantes correlaciona-se com alto grau histológico no câncer de mama (Egawa *et al.*, 2001).

Apesar das evidências do envolvimento de hormônios sexuais femininos na carcinogênese do câncer de tireóide, até o momento não foi demonstrado claramente que há alteração do risco em relação a fatores hormonais, menstruais ou reprodutivos (Negri *et al.*, 1999; Horn-Ross *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2006).

2.4 - HISTÓRIA FAMILIAR

Dos tipos de câncer de tireóide, o carcinoma medular da tireóide (MTC) é o mais influenciado por fatores genéticos, sendo herdado de forma autossômica dominante em 20% dos casos, através de mutações germinativas no gene *RET*. Nesse caso podem ocorrer as síndromes endócrinas MEN2A e MEN2B (neoplasias endócrinas múltiplas - tipo 2A e 2B), e também o MTC familiar (Le & Norton, 2000).

Os tumores não-medulares da tireóide (NMTC) são geralmente esporádicos, mas a ocorrência familiar ocorre em 3-7% dos casos (Gimm, 2001). Tem sido relatado que a história familiar de doença de tireóide maligna ou benigna, em parentes de primeiro grau, aumenta moderadamente o risco para o câncer esporádico de tireóide, sobretudo para mulheres com menos de 35 anos (Mack *et al.*, 2002). Quando um dos pais ou irmãos tem câncer de tireóide, o risco de desenvolver carcinoma derivado de células foliculares da tireóide aumenta de 3,2 vezes e de 6,2 vezes, respectivamente (Kondo *et al.*, 2006). Entre todos os tipos de câncer que não mostram uma herança mendeliana regular, o câncer de tireóide apresenta o mais alto risco relativo para parentes de primeiro grau de probandos, o que sugere o envolvimento de genes ou grupos de genes de média penetrância, incluindo genes supressores de tumor, proto-oncogenes e genes de susceptibilidade (Huang *et al.*, 2001; Hemminki *et al.*, 2005).

Dentre as síndromes tumorais que são devidas a mutações geminativas e estão associadas com cânceres familiares não-medulares de tireóide incluem-se a polipose adenomatosa familiar (mutação no gene *APC*), doença de Cowden (mutação no gene *PTEN*) e síndrome de Werner (mutação no gene *WRN*) (Gimm, 2001; Kondo *et al.*, 2006).

2.5 - OUTROS FATORES DE RISCO

A ingestão de iodo tem sido investigada em relação ao risco para o câncer de tireóide. Em geral, as áreas com deficiência crônica de iodo e bócio endêmico estão associadas a um risco aumentado para o carcinoma folicular da tireóide (FTC) e carcinoma anaplásico da tireóide (ATC). As áreas de alta ingestão crônica de iodo podem ter risco aumentado para o PTC (Horn-Ross *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2006), mas ainda existem controvérsias sobre o papel do iodo na carcinogênese da tireóide (Ward, 2005; Kondo *et al.*, 2006).

A exposição a estrógenos exógenos, como os fitoestrógenos, através da alimentação, também tem sido investigada. Os fitoestrógenos em alguns tecidos podem apresentar atividade anti-estrogênica por competição pelo receptor estrogênico (apresentam uma potência agonista mais fraca que estrógenos endógenos) ou através de alteração do metabolismo hormonal (Horn-Ross *et al.*, 2002). Não há ainda relações causais claramente estabelecidas entre o câncer de tireóide e o uso de hormônios sexuais exógenos (Horn-Ross *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2006).

A ocorrência do câncer de tireóide em associação com a Doença de Graves tem sido relatada em diversos estudos, embora não se possa afirmar que esta condição determina um risco maior de câncer do que o da população geral. A Doença de Graves (DG) é uma doença auto-imune na qual anticorpos anti-receptores do TSH (TRAb) levam ao aumento da síntese e liberação de grande quantidade de hormônios tireoidianos, resultando em tireotoxicose. Vários autores especulam que o anticorpo estimulador do receptor do TSH (hormônio

estimulante da tireóide) possa desempenhar um papel promotor da carcinogênese tireoideana similar ao atribuído ao TSH, ou seja, por hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais foliculares, com alta taxa de mitoses. Também já foram descritas mutações ativadoras do receptor de TSH (TSHR) em adenomas tireoideanos e, mais raramente, em carcinomas tireoideanos hipofuncionantes ou hiperfuncionantes. No entanto, a relação entre mutações do TSHR e carcinogênese na DG parece ser indireta. O TSHR com alterações estruturais, ao ser estimulado pelo TRAb, pode ativar preferencialmente uma ou outra via de transdução de sinal, tendo, desta forma, diferentes efeitos sobre a função e o crescimento celular tireoidiano. Assim, o ambiente auto-imune da DG pode permitir e auxiliar o crescimento de células neoplásicas tireoideanas (Peixoto *et al.*, 2003).

A tireoidite linfocítica também é um possível fator de risco para o câncer de tireóide. É frequentemente observada no PTC e recentes análises moleculares indicaram que abriga potenciais lesões precursoras de malignidade, mas ainda não se sabe se isso representa uma resposta reativa ao evento tumoral ou se é um pré-requisito para que este ocorra (Kondo *et al.*, 2006).

Uma possível associação entre doenças auto-imunes da tireóide e a ocorrência de anticorpos anti-p53 tem sido considerada. A presença desses anticorpos provavelmente leva ao aumento do risco de doenças neoplásicas (Peixoto *et al.*, 2003).

3 - OS TIPOS DE TUMORES DA TIREÓIDE

A glândula tireóide, o maior órgão endócrino em humanos, regula o metabolismo sistêmico através dos hormônios tireoideanos que produz. Histologicamente, sua unidade funcional é o folículo tireoideano e possui 2 tipos celulares principais de origens embrionárias distintas, designadas células foliculares e células C parafoliculares.

O epitélio da tireóide é composto basicamente pelas células foliculares, que são responsáveis pela captação de iodo e pela síntese, armazenamento e secreção dos hormônios tireoideanos L-triiodotironina (T3) e L-tiroxina (T4), sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que é secretado pelo hipotálamo, estimula a liberação do hormônio estimulador da tireóide (TSH) pela hipófise anterior. O TSH estimula as células foliculares a sintetizarem e secretarem os hormônios tireoideanos.

As células C são células neuro-endócrinas de localização intrafolicular ou parafolicular, dedicadas à produção da calcitonina, um hormônio regulador do cálcio (Kondo *et al.*, 2006) (**FIGURA 3**).

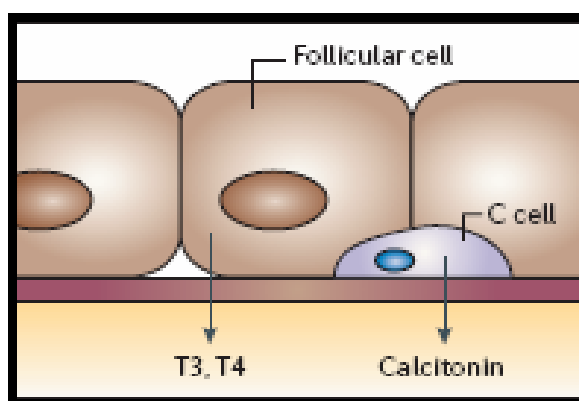


FIGURA 3 – Esquema representativo das células C e células foliculares da tireóide e seus produtos hormonais. (Fonte: modificado de Kondo *et al.*, 2006).

Os tumores tireoideanos podem ser benignos ou malignos e derivados principalmente das células epiteliais foliculares ou das células C parafoliculares. Mais de 95% dos tumores malignos da tireóide são derivados das células foliculares e uma minoria de tumores (3%), denominados carcinomas medulares da tireóide, origina-se das células C (Kondo *et al.*, 2006). Outros tumores primários da tireóide que são muito menos comuns incluem os linfomas, sarcomas e os carcinomas de células epidermóides (Gheriani, 2006).

3.1 - TUMORES DAS CÉLULAS EPITELIAIS FOLICULARES

3.1.1 - TUMORES BENIGNOS

Os adenomas foliculares são as neoplasias benignas mais comuns da tireóide, ocorrendo em grande parte dos nódulos solitários encontrados. Têm maior incidência no sexo feminino e podem acometer qualquer idade, mas a maioria dos casos ocorre em adultos de 20-50 anos (Liska *et al.*, 2005).

Esses tumores apresentam-se como uma proliferação neoplásica benigna e bem encapsulada dos folículos tireoideanos, com um padrão proliferativo distinto em relação ao parênquima tireoideano adjacente. A morfologia histológica em folículos é mantida e a diferenciação das células do epitélio folicular é semelhante à encontrada no tecido tireoideano normal, ou seja, com mínimo pleomorfismo. Em geral são tumores uninodulares, bem delimitados e isolados do parênquima adjacente por uma cápsula fibrosa microscopicamente íntegra e de espessura variável. As células tumorais dos adenomas não apresentam invasão da cápsula ou angioinvasão e a distinção entre o adenoma e o carcinoma folicular está baseada exatamente nessa característica, uma vez que este carcinoma vai sempre apresentar invasão capsular ou vascular.

Inclui-se entre os adenomas foliculares a variante citológica de células de Hürthle, um tipo de célula folicular descrito pela primeira vez pelo histologista alemão “Hürthle”. As células de Hürthle são poligonais, largas e caracterizadas pelo grande número de mitocôndrias que conferem um aspecto citoplasmático granular eosinofílico e de coloração castanha, vindo daí o sinônimo célula eosinofílica. Outros sinônimos incluem células “Askanazy” e células oxifílicas. Não se sabe ainda a importância desse tipo celular no folículo tireoideano. Os tumores de células de Hürthle podem ser benignos ou malignos e, assim como nos tumores foliculares, essa distinção se dá através da demonstração histológica de invasão capsular ou vascular (Sriram & Patacsil, 2004; Gheriani, 2006). Um tumor é classificado como tumor de

célula de Hürthle quando mais de 75% das células foliculares presentes forem células de Hürthle (Liska *et al.*, 2005).

De uma forma geral, pode-se afirmar que existe certa dificuldade, em alguns casos, no diagnóstico diferencial de tumores da tireóide com um padrão histológico folicular, que incluem nódulos hiperplásicos, nódulos adenomatóides, adenomas foliculares, carcinomas foliculares, e a variante folicular do carcinoma papilífero (Liska *et al.*, 2005).

3.1.2 – TUMORES MALIGNOS

Os tumores malignos derivados das células foliculares são classificados de acordo com parâmetros histológicos e clínicos, e têm diferentes graus de diferenciação celular, podendo apresentar-se desde tumores bem-diferenciados a indiferenciados (Kondo *et al.*, 2006).

3.1.2.1 – Tumores malignos bem-diferenciados

Os tumores malignos bem-diferenciados da tireóide incluem o Carcinoma Folicular da Tireóide (FTC) e o Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC), além de suas variantes histológicas. Juntos, esses tumores representam mais de 95% dos tumores malignos da tireóide (Cheah, 2007). Manifestam-se, em sua maioria, em pacientes de 20-50 anos de idade e são de 2-4 vezes mais frequentes em mulheres (Kondo *et al.*, 2006).

Os carcinomas bem-diferenciados da tireóide, em sua maioria, comportam-se de maneira indolente, apresentando crescimento e evolução lentos e excelente prognóstico, podendo ser efetivamente controlados por tratamento convencional de resecção cirúrgica seguida ou não de ablação com iodo radioativo (Kondo *et al.*, 2006).

A manutenção de várias características morfológicas e funções que são encontradas na célula folicular normal é observada nesses tumores, como a expressão de tireoglobulina e da proteína NIS (*sodium iodide symporter* - “proteína simportadora de iodeto e sódio”). A expressão normal dessa proteína transportadora de iodeto de sódio é que torna eficaz o

tratamento ablativo de remanescentes tireoideanos e de metástases com ^{131}I , permitindo a remissão permanente na maioria dos pacientes e em quase 50% daqueles com metástases à distância. Entretanto, em cerca de 30% dos pacientes ocorre desdiferenciação, ou seja, perda de funções e propriedades específicas da célula folicular, incluindo a perda da expressão adequada de proteínas (Huang *et al.*, 2001). Neste caso, o prognóstico piora bastante e os tumores passam a ser indiferenciados ou anaplásicos, com rápido crescimento e inacessíveis à terapia convencional em função da não captação de ^{131}I (Frasca *et al.*, 2003; Graf, 2005). Atualmente ainda não se conhece uma forma efetiva de tratamento para esses tumores (Kondo *et al.*, 2006).

O PTC é o tumor maligno mais comum da tireóide, sendo responsável por 85-90% de todos os cânceres de tireóide e da mesma forma que os carcinomas bem-diferenciados como um todo, em sua maioria ocorre em pacientes de 20-50 anos de idade, 2-4 vezes mais em mulheres do que em homens. Sua taxa de sobrevivência para o período de 10 anos ultrapassa 90% (Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007).

Inicialmente o diagnóstico histológico do PTC foi baseado apenas na presença do padrão clássico de arquitetura papilífera - projeções papilares formadas de pedículos fibrovasculares recobertos por epitélio; mas atualmente considera principalmente alguns aspectos morfológicos nucleares característicos, que podem coexistir com estruturas foliculares e papilíferas. Dentre esses aspectos pode-se citar o aumento do núcleo; irregularidade do contorno nuclear, com sulcos longitudinais, cromatina com aspecto hialino e a presença de pseudoinclusões (invaginações citoplasmáticas). Além dessas características nucleares, microscopicamente também é comum observar a presença de corpos psamomatosos (lâminas de material calcário que representam necrose de células tumorais com calcificação), infiltrado linfóide e fibrose (Liska *et al.*, 2005, Adeniran *et al.*, 2006).

Por ser um tumor bem-diferenciado, o PTC clássico é associado a um bom prognóstico, sendo facilmente curável com cirurgia e tratamentos médicos convencionais. Porém, alguns fatores como idade avançada, gênero masculino, maior tamanho do tumor, ausência de cápsula tumoral, extensão extratireoideana e metástases distantes estão associados a uma evolução mais agressiva da neoplasia (Kondo *et al.*, 2006; Adeniran *et al.*, 2006).

Um padrão de crescimento infiltrativo, multicêntrico e com disseminação regional para linfonodos é freqüentemente encontrado, mas não altera o bom prognóstico atribuído ao PTC. A multifocalidade ocorre em 25-65% dos casos e embora seja atribuída tradicionalmente a metástases intraparenquimatosas, sabe-se que pode também originar-se a partir de precursores independentes (Liska *et al.*, 2005; Cheah, 2007). A recorrência em linfonodos locais no pescoço está presente em 30-66% dos pacientes (Liska *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007), enquanto a metástase distante é encontrada em 5-10%, principalmente em pulmão e ossos (Liska *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006).

Muitas variantes histológicas do PTC têm sido reconhecidas, cada uma com comportamento e padrões proliferativos próprios. Embora possam não apresentar a arquitetura papilífera clássica, mantêm os aspectos citológicos característicos do PTC. Algumas apresentam prognóstico mais agressivo em relação ao PTC clássico, enquanto outras possuem prognóstico melhor ou semelhante a este (**TABELA 2**).

TABELA 2 – Algumas variantes do Carcinoma Papilífero - classificação de acordo com o prognóstico em relação ao PTC clássico.

Prognóstico	Tipo de PTC (variante)	Referência bibliográfica
Pior	Var. esclerosante difusa	Michels <i>et al.</i> , 2007; Liska <i>et al.</i> , 2005
	Var. folicular difusa	Michels <i>et al.</i> , 2007; Liska <i>et al.</i> , 2005
	Var. de cel. altas	Michels <i>et al.</i> , 2007; Liska <i>et al.</i> , 2005
	Var. de cel. colunares	Michels <i>et al.</i> , 2007; Prendiville <i>et al.</i> , 2000
	Var. sólida	Collini <i>et al.</i> , 2006, Nikiforov <i>et al.</i> , 2001
	Var. de cél. oxifílicas	Maxwell <i>et al.</i> , 2006, Mai <i>et al.</i> , 2004
Melhor	Var. encapsulada	Liska <i>et al.</i> , 2005
	Microcarcinoma	Liska <i>et al.</i> , 2005
Semelhante	Var. folicular	Michels <i>et al.</i> , 2007, Liska <i>et al.</i> , 2005

Os microcarcinomas papilíferos, também conhecidos como carcinomas ocultos, caracterizam-se por apresentarem tumores com 1 cm ou menos de diâmetro. Frequentemente são multifocais e costumam ser achados incidentalmente, sendo possível viver com esses carcinomas e morrer de outras causas, sem que se manifestem clinicamente. São considerados de baixa significância clínica (Kondo *et al.*, 2006).

A variante folicular do PTC (PTCVF) é a mais frequente depois do PTC clássico. Foi primeiramente descrita por Lindsay em 1953 (Basílio-de-Oliveira, 1990) e apresenta-se como um tumor composto predominantemente ou exclusivamente de folículos com células de

aspecto nuclear característico do PTC, em sua maioria com comportamento clínico similar ao PTC clássico, ou seja, com bom prognóstico. Pode-se dizer que o diagnóstico diferencial dessa variante não é difícil em relação às outras variantes do PTC; porém o mesmo não se aplica em relação a outras neoplasias com padrão proliferativo folicular. Mais de 15% dos PTCFV podem ter invasão capsular e vascular, dificultando no diagnóstico diferencial do carcinoma folicular da tireóide (FTC), que também vai apresentar tais características. Já os PTCFV que não apresentam invasão capsular e vascular precisam ser diferenciados dos adenomas foliculares. Outro fator que dificulta o diagnóstico dos PTCVF é o fato de poderem apresentar-se junto com o bócio multinodular, fazendo com que muitas vezes sejam confundidos com nódulos adenomatóides. A observação cuidadosa das características nucleares próprias do PTC é a única maneira segura de fazer esses diagnósticos diferenciais, em termos histológicos. Porém, em alguns casos esses aspectos nucleares encontram-se apenas focalmente distribuídos no tumor, tornando o diagnóstico controverso, podendo ser considerado desde microfocos de PTC crescendo em um nódulo benigno a um nódulo maligno de PTCVF; sendo considerada esta segunda escolha mais segura, por parte de alguns especialistas (LiVolsi & Baloch, 2004; Baloch & Livolsi, 2007).

Embora o PTCVF normalmente se apresente encapsulado, pode ocorrer também como uma rara variante, a variante folicular difusa. Esta variante difusa não-encapsulada ocorre principalmente em mulheres jovens e acomete toda a tireóide. Está associada com invasão vascular, extensão extratireoideana e metástase distante, principalmente para ossos e pulmão (Baloch & Livolsi, 2007).

A variante de células altas representa cerca de 5-10% dos casos de PTC. É composta de células com altura maior que o dobro da largura em mais de 30% do tumor. Esses tumores costumam ser maiores ao diagnóstico e, sobretudo em pacientes com mais de 50 anos, apresentam mais facilmente invasão extratireoideana e invasão vascular do que o PTC

clássico, assim como metástases distantes para ossos e pulmão; apresentando maior taxa de mortalidade (Basolo *et al.*, 2002; Prendiville *et al.*, 2000).

A variante sólida é considerada rara e representa apenas 3% dos carcinomas papilíferos. Também chamada de insular, é composta de cerca de 50% ou mais de componentes sólidos, ou seja, grupamentos predominantemente celulares. Esses componentes sólidos são mais comumente observados em tumores de crianças e adultos jovens, principalmente se foram expostos à radiação ionizante. Ainda não há um consenso sobre a influência de tal padrão proliferativo sobre o prognóstico do PTC, mas relatam-se taxas similares de recorrência do tumor, frequência maior de metástase distante e prognóstico menos favorável que o do PTC clássico (Nikiforov *et al.*, 2001).

A variante encapsulada do PTC possui cápsula fibrosa bem demarcada que separa o tumor do tecido normal adjacente. É comum ocorrer a infiltração capsular, mas não se observa invasão vascular. Macroscopicamente se assemelha a um adenoma folicular, porém ao microscópio observam-se as características histo-citológicas típicas do PTC, além dos corpos psamomatosos.

Dentre as variantes consideradas mais agressivas inclui-se a variante esclerosante difusa. Essa é uma variante rara, representando apenas cerca de 1,8% dos casos de PTC, preponderante em pacientes mais jovens do sexo feminino, com comprometimento difuso de um ou ambos os lobos da tireóide através de disseminação linfática intraglandular. Tem morfologia característica e observa-se o exagero dos diferentes componentes estruturais do PTC, além de apresentar infiltração linfóide, fibrose extensa e muitos corpos psamomatosos. A incidência significativa de metástases em linfonodos regionais e pulmonares demonstra grande capacidade de disseminação dessa variante, exigindo conduta terapêutica mais agressiva (Sheu *et al.*, 2007).

O Carcinoma folicular da tireóide (FTC) é o segundo tipo mais comum de carcinoma da tireóide, sendo responsável por 10-15% dos casos. Em regiões que apresentam deficiência de iodo a prevalência do FTC pode chegar a 25-40% dos cânceres de tireóide, mas a frequência de seu diagnóstico tem diminuído, provavelmente pela adição de iodo ao sal, nessas regiões. Ocorre 2-3 vezes mais em mulheres do que em homens, principalmente na faixa de 40-60 anos de idade e sua taxa de sobrevivência para o período de 10 anos é de 80-90% (Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007).

Clinicamente, o FTC apresenta-se comumente como uma massa tumoral isolada bem definida na tireóide, medindo de 2-4 cm. Ao contrário do PTC, é rara a ocorrência de nódulos incidentais, ou seja, carcinomas foliculares ocultos; assim como a disseminação para linfonodos regionais, que está presente em menos de 5% dos casos. (Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007). Por não apresentar os traços citológicos típicos de malignidade, como o PTC, o diagnóstico histológico do FTC depende em grande parte da demonstração de invasão capsular ou vascular. Dessa forma, esses tumores são classificados em minimamente invasivos, quando existe apenas invasão capsular, ou extensamente invasivos, quando a angioinvasão é evidente.

Os FTC minimamente invasivos são tumores bem-diferenciados e têm, em sua maioria, excelente prognóstico; assemelhando-se bastante com os adenomas foliculares, a não ser pela presença de invasão capsular. Os FTC extensivamente invasivos costumam apresentar-se como tumores foliculares de padrão proliferativo sólido, pouco diferenciados e caracterizados por intensa disseminação hematogênica. A metástase distante geralmente ocorre, nesses casos, para pulmões, fígado, ossos e cérebro. Há relatos de alguns casos de tumores minimamente invasivos apresentarem metástase distante, mas são raros (Liska *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006; Baloch & Livolsi, 2007).

As variantes do FTC incluem a oncocítica ou de células de Hürthle e a de células claras (Suster, 2006; Baloch & Livolsi, 2007).

Carcinomas tireoideanos mistos com padrões histopatológicos folicular e papilífero simultâneos são classificados como PTC, pois apresentam comportamento biológico e prognósticos semelhantes a esse tipo de tumor (Liska *et al.*, 2005).

3.1.2.2 – Tumores malignos indiferenciados

Os carcinomas indiferenciados da tireóide, também chamados de Carcinomas Anaplásicos da Tireóide (ATC), são tumores considerados como a mais letal e agressiva malignidade humana (Hunt *et al.*, 2003). São neoplasias raras, representando de 1-5% de todos os carcinomas da tireóide, mas em áreas de bócio endêmico sua incidência pode aumentar em até dez vezes (Liska *et al.*, 2005). Ocorrem mais em mulheres (1,5 vezes) do que em homens, preferencialmente entre os 60 e 80 anos de idade (Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007).

Aproximadamente 50% dos tumores anaplásicos apresentam coexistência histologicamente evidente com carcinomas bem-diferenciados da tireóide à biópsia cirúrgica, principalmente com o PTC; o que pode ser um forte indício de que são originados pela dediferenciação desses carcinomas. Uma vez que a transformação anaplásica é a mais séria complicação dos carcinomas bem-diferenciados, o temor de que ocorra constitui forte justificativa para um tratamento radical dos mesmos (Hunt *et al.*, 2003; Liska *et al.*, 2005).

O ATC apresenta-se clinicamente como uma massa sólida no pescoço, com tamanho variando de 3-20 cm, crescimento rápido e invasivo em direção aos tecidos moles adjacentes, como o tecido gorduroso peritireoideano, traquéia e esôfago. Sintomas locais de compressão ocorrem na maioria dos pacientes, como disfagia, disfonia, dispnéia e dor no pescoço. Macroscopicamente é composto de tecido denso, granular, acinzentado e não-encapsulado. As

metástases são comuns, ocorrendo em 40% dos casos em linfonodos e em 20-50% dos casos à distância, principalmente para os pulmões, ossos e cérebro (Pasiëka, 2003; Kondo *et al.*, 2006). Regiões necróticas e hemorrágicas são achados não-raros e microscopicamente pode-se distinguir três padrões histológicos baseados na morfologia celular predominante, que pode ser fusiforme (53%), célula gigante (50%), e célula escamosa (19%). Embora morfologicamente apresentem diferenças marcantes entre si, essas variantes parecem ter comportamentos semelhantes em relação ao prognóstico, havendo nítida ausência de diferenciação celular, o que é constatado pelo fato de raramente se observar a expressão de tireoglobulina nesses carcinomas (Muro-Cacho & Ku, 2000).

O diagnóstico do ATC é geralmente feito ao exame clínico e confirmado em 90% dos casos por PAAF no tumor primário ou metástase em linfonodos (Pasiëka, 2003). O prognóstico desses tumores indiferenciados é muito ruim, sendo quase sempre fatais, com a exceção para os raros casos que podem ser inteiramente ressectados à cirurgia (Hunt *et al.*, 2003). O óbito geralmente ocorre dentro de 1 ano após o diagnóstico e a taxa de sobrevivência em 5 anos é de 1-17%, enquanto em 10 anos tem valor nulo, apesar da agressiva conduta terapêutica empregada (Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007).

Atualmente não existe um tratamento eficaz para o ATC, que é altamente resistente às terapias convencionalmente empregadas (cirurgia, quimioterapia, radioterapia). Alguns recursos paliativos são usados, como por exemplo, a traqueostomia para garantir a respiração do paciente (Gheriani, 2006). Recursos de imagem, como a Tomografia computadorizada, têm auxiliado no planejamento do procedimento cirúrgico de ressecção do tumor, avaliando a extensão local e a presença de metástases distantes. Não se faz uso de terapia ablativa com iodo radioativo para esses tumores, uma vez que suas células indiferenciadas não o captam (Pasiëka, 2003). A raridade relativa, natureza agressiva, assim como o rápido e fatal curso do ATC são fatores que dificultam o desenvolvimento de um tratamento eficaz. Novas

modalidades de tratamento são urgentes e as terapias com bases moleculares têm sido investigadas, sendo as mais promissoras (Cornett *et al.*, 2007).

3.2 - TUMORES DAS CÉLULAS C – PARAFOLICULARES

O principal tumor originado das células C-parafoliculares é o Carcinoma Medular da Tireóide (MTC). Este tumor maligno representa cerca de 2-10% dos carcinomas da tireóide, ocorre principalmente na faixa de 30-60 anos de idade e é sutilmente mais freqüente em mulheres que em homens, embora as mulheres estejam associadas a um melhor prognóstico. Este tipo de tumor costuma apresentar um crescimento lento e a sobrevida em 10 anos é de 80% (Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007).

Ao exame histopatológico, o tumor é composto de células de formas variáveis (redondas, cubóides, fusiformes), e não se observa a formação de folículos ou papilas. Edemas intersticiais e outras alterações do estroma são comuns e por causa do típico aspecto estromal apresentado, o termo carcinoma medular com estroma amilóide é frequentemente empregado (Liska *et al.*, 2005).

Diferentemente do PTC e FTC, que são tumores originados a partir das células foliculares, O MTC não capta iodo, mas secreta calcitonina. Entretanto, a hipocalcemia devida ao excesso de calcitonina é raramente observada. Ele apresenta caracteristicamente disseminação local para linfonodos, que ocorre em 50% dos casos na apresentação inicial, e também metástases distantes em 15% dos casos, geralmente para o fígado, ossos e mediastino superior (Liska *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006).

Muitas variantes histológicas do carcinoma medular têm sido reconhecidas (glandular ou folicular, oxifílica, de células gigantes, de células claras, de células fusiformes, pigmentada, escamosa, papilífera, de pequenas células, microcarcinomas e outras), mas em sua maioria não possuem importância prognóstica (Liska *et al.*, 2005).

O carcinoma medular da tireóide pode ocorrer de forma esporádica ou familiar, sendo 25% dos casos do tipo familiar. Os casos familiares podem ocorrer como neoplasia isolada (MTC familiar) ou fazendo parte da síndrome de Neoplasias Endócrinas Múltiplas(MEN), que pode ser do tipo 2A ou 2B. O termo carcinoma da tireóide medular familiar (MTC familiar) tem sido usado quando ao menos 4 casos são encontrados em uma família na ausência de outros neoplasmas associados (Puñales *et al.*, 2004). Nos casos de neoplasia endócrina múltipla o MTC ocorre principalmente com feocromocitoma, neoplasia da paratireóide ou múltiplos neuromas (Cheah, 2007).

4 - ALTERAÇÕES GENÉTICAS NO CÂNCER DE TIREÓIDE

O câncer é considerado uma doença do genoma, sendo atualmente aceito para sua patogênese molecular o modelo da carcinogênese em múltiplos passos, em que os tumores se desenvolvem como resultado do acúmulo seqüencial de erros genéticos em genes envolvidos no controle da proliferação celular, diferenciação ou morte celular. De uma maneira sucinta pode-se dizer que esses erros genéticos em genes-alvo conduzem à expansão clonal de células geneticamente modificadas que progressivamente mostram uma vantagem de crescimento seletiva sobre células não-transformadas normais, podendo adquirir potencial maligno, invasivo e metastático; permitindo assim a progressão tumoral (Moretti *et al.*, 2000). As alterações genéticas podem modificar a quantidade e/ou a função dos produtos codificados pelos genes afetados, alterando o funcionamento normal da célula.

As duas principais classes de genes afetados são os genes supressores de tumor, que têm sua função inibida; e os proto-oncogenes, que ficam ativados. Os genes supressores de tumor normalmente se opõem ao desenvolvimento tumoral e regulam a morte celular. Os proto-oncogenes levam à divisão celular e interferem na diferenciação celular normal. Dessa

forma, pode-se dizer que uma vez que o câncer esteja instalado, ao menos dois processos celulares estarão alterados – divisão e morte – o que resultará em uma proliferação celular exacerbada (Pollock & Meltzer, 2002).

A identificação de genes alterados no processo de carcinogênese tem sido um dos principais alvos da pesquisa nos diversos tipos de câncer. Os tumores derivados do epitélio folicular da tireóide representam um interessante e singular modelo de estudo para a compreensão da patogênese molecular do câncer, porque englobam um largo espectro de fenótipos com taxas de crescimento, diferenciação e agressividade variáveis, apesar de serem originados de um único tipo celular (Moretti *et al.*, 2000; Fagin, 2002). Alguns fatores ambientais, como a deficiência de iodo e a radiação ionizante parecem influenciar também nos aspectos genotípicos e fenotípicos do câncer de tireóide, ou seja, correlaciona-se a exposição a esses fatores ambientais com alterações genéticas e variantes histológicas tumorais específicas.

O grande número de estudos realizados com tumores tireoideanos tem permitido propor a hipótese de que diferentes eventos genéticos são capazes de desencadear a proliferação celular e promover a progressão tumoral, por diferentes vias (**TABELA 3**). Os genes envolvidos podem ser de uma forma genérica classificados como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor, dependendo de sua função normal na célula. Alterações simultâneas em genes da mesma via de sinalização são encontradas em apenas uma minoria dos casos estudados; o que sugere um papel intercambiável para esses genes na iniciação da tumorigênese epitelial da tireóide (Suarez, 2000).

TABELA 3 – Alterações moleculares observadas nas neoplasias da tireóide. TK – tirosina-quinase; *RET/PTC* – rearranjos do gene *RET* com vários genes heterólogos; Gs- α - subunidade α da proteína G estimulatória; GTPase – enzima com atividade guanidina fosfatase; LOH – perda de heterozigose (Learoyd *et al.*, 2000; Salabè, 2001; Gimm, 2001; Kondo *et al.*, 2006).

Classe	Gene	Função	Alteração genética
Oncogenes			
Receptores de membrana	<i>RET</i>	Receptor com atividade TK	Rearranjo <i>RET/PTC</i> Mutações
	<i>NTRK1</i>	Receptor com atividade TK	Rearranjo
	<i>MET</i>	Receptor com atividade TK	Expressão aumentada
	<i>TSHR</i>	Receptor acoplado a proteína G	Mutação
Transdutores de sinal	<i>GNAS1</i>	Proteína Gs- α (GTPase)	Mutação
	<i>RAS</i>	Pequena proteína G (GTPase)	Mutação
	<i>BRAF</i>	Proteína serina/treonina quinase	Mutação Rearranjo
Supressores de tumor	<i>TP53</i>	Parada do ciclo celular em G ₁ , apoptose	Mutação, LOH, Expressão aumentada
	<i>APC</i>	Modulação da atividade da β -catenina	Mutação
	<i>PTEN</i>	Proteína tirosina fosfatase	LOH Expressão diminuída

Na patogênese molecular de nódulos benignos hiperfuncionantes da tireóide (adenomas e nódulos de bócio multinodular) é descrito o envolvimento do gene do receptor

de TSH (*TSHR*) e do gene que codifica a subunidade α da proteína GS (*GNAS₁*), efetora da via de sinalização do TSH. O *TSHR* pertence à família de receptores acoplados à proteína G, possuindo um domínio de ligação extracelular, um domínio intracelular que ativa a proteína G e uma região que atravessa a membrana sete vezes (domínios transmembrana). A ligação do TSH ao seu receptor ativa a proteína G estimulatória e a via de sinalização do AMP cíclico (AMPc), que vai induzir a transcrição de importantes genes para o funcionamento normal da célula folicular da tireóide (**FIGURA 5**) (Fagin, 2005; Kondo *et al.*, 2006).

Mutações no *TSHR* e no *GNAS₁* ativam constitutivamente essa via, havendo uma superprodução de AMPc intracelular que estimula não só o crescimento, mas também a função tireoideana, ou seja, ocorre um aumento da expressão de produtos gênicos próprios da célula tireoideana diferenciada, como tireoglobulina e a proteína simportadora de iodo e sódio. As mutações do *TSHR* são freqüentes no exon 10, embora outras mutações também já tenham sido descritas. No caso do gene *GNAS₁*, duas posições *hot-spots* são descritas, nos códons 201 e 227, correspondendo ambas ao domínio de ligação de GTP (Learoyd, 2000). Existe uma grande variabilidade na prevalência dessas mutações observadas nos vários estudos realizados (3-82% para o *TSHR* e 7-38% para *GNAS₁*), que pode ser devida a vários fatores, como o grau de deficiência de iodo e a carga genética da população estudada, o pequeno tamanho amostral de alguns estudos e o método empregado para avaliar a presença da mutação, como por exemplo a extensão do gene analisada (Moretti *et al.*, 2000). Em tumores malignos as mutações ativadoras da via de sinalização do AMPc são raras, o que é coerente com observação clínica de que nódulos tireoideanos hiperfuncionantes tendem a ser benignos. Essas evidências indicam que apenas a ativação constitutiva da via do AMPc é insuficiente para haver transformação maligna das células foliculares tireoideanas (Kondo *et al.*, 2006).

A patogênese da hiperplasia da tireóide não pode ser explicada somente pela ação do *TSHR* ou da proteína Gs, uma vez que um subgrupo de adenomas hiperfuncionantes não

exibe mutação nos genes correspondentes a essas moléculas, sugerindo-se que alterações em outros genes participantes da via de sinalização do AMPc provavelmente contribuem para esses casos, ou ainda que vários outros estímulos estão implicados, como hormônios e citocinas atuando como fatores de crescimento (Moretti *et al.*, 2000; Salabè, 2001).

Modelos baseados em observações moleculares, clínicas e histológicas têm sido propostos e atualizados por diversos autores (Gimm, 2001; Kondo *et al.*, 2006), no intuito de elucidar as etapas responsáveis pelo desenvolvimento de tumores malignos a partir da célula folicular. Esses modelos abrangem desde os eventos genéticos iniciais que promovem a proliferação da célula folicular, resultando em neoplasias benignas ou transformação maligna, até eventos adicionais mais tardios, considerados responsáveis pelo surgimento dos tumores indiferenciados da tireóide. Segundo esses modelos, no heterogêneo grupo de neoplasias tireoideanas alterações moleculares específicas não só determinam padrões de expressão gênica diferencial, mas também influenciam na variante histológica e comportamento tumoral observados (**FIGURA 4**). A instabilidade genômica induzida pela exposição a diversos fatores de risco pode resultar em eventos iniciais de transformação maligna da célula folicular que envolvem principalmente proto-oncogenes da via de sinalização de proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPK), incluindo receptores e efetores dessa via (RET, RAS, BRAF). Rearranjos gênicos do gene do receptor tirosina-quinase RET são caracteristicamente observados no PTC e suas variantes, enquanto mutações somáticas ou germinativas nesse gene são encontradas no carcinoma das células C da tireóide, o carcinoma medular. Alterações no gene da proteína-quinase BRAF são caracteristicamente encontradas no PTC, enquanto mutações no gene da proteína-quinase RAS são mais comuns em lesões com arquitetura folicular, incluindo o FTC e a variante folicular do PTC, embora se discuta a importância da presença dessas mutações em tumores benignos como evento inicial na

tumorigênese da tireóide e também sua implicação na progressão tumoral, por também ocorrerem em carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados da tireóide.

As alterações genéticas iniciais na tumorigênese da tireóide tendem a aumentar ainda mais a instabilidade genômica, levando a alterações tardias que envolvem outras vias de sinalização, reguladores do ciclo celular e várias moléculas de adesão; o que pode resultar na desdiferenciação de carcinomas bem-diferenciados. Acredita-se que a maior parte dos carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados (ATC) derivem desse processo, mas também podem ocorrer “de novo”. As principais alterações genéticas relacionadas com a desdiferenciação incluem mutações no gene supressor de tumor *TP53* e acúmulo nuclear da proteína p53 inativa, além de perda de heterozigose (LOH), mais freqüentemente observada em carcinomas e adenomas foliculares do que no PTC (Moretti *et al.*, 2000; Gimm, 2001; Kondo *et al.*, 2006).

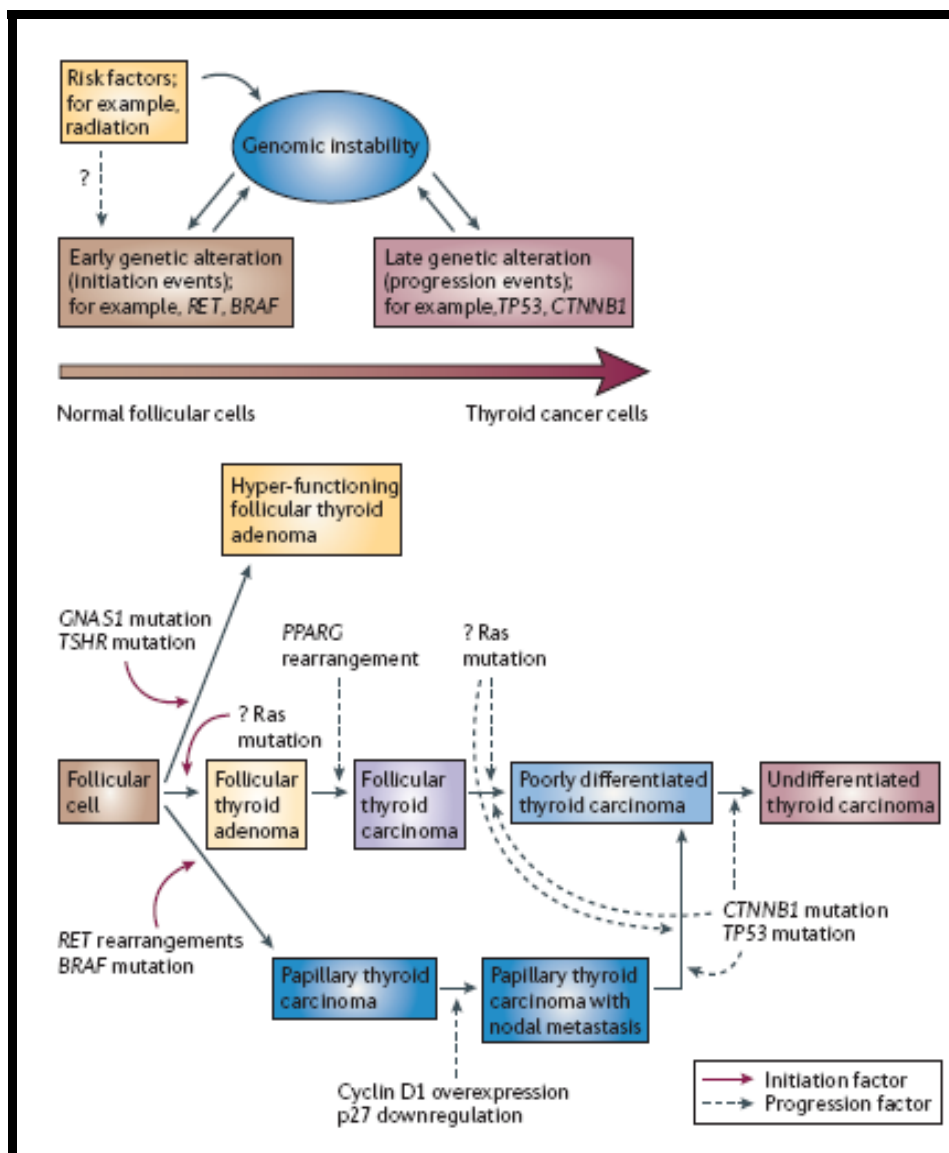


FIGURA 4 – Esquema representativo do modelo de carcinogênese em múltiplos passos nas neoplasias da tireóide. *CTNNB1* – gene da β -catenina, *PPARG* – gene do receptor nuclear PPAR γ , Cyclin D1 – ciclina D1; p27 – inibidor de ciclina depende de quinase (Fonte:Kondo *et al.*, 2006).

4.1 - PROTO-ONCOGENES E OS TUMORES DA TIREÓIDE

Os proto-oncogenes promovem o crescimento normal e a diferenciação celular, constituindo uma classe de genes que são, juntamente com os genes supressores de tumor, alvos principais para danos genéticos, os quais podem levar ao câncer. As alterações genéticas que levam à ativação dos proto-oncogenes conferem uma vantagem de crescimento à célula

tumoral, podendo ser uma mutação, amplificação gênica ou rearranjos cromossômicos. O produto codificado pelo alelo mutante possui um efeito dominante sobre o produto do alelo normal, ou seja, apenas um evento mutacional é requerido para que haja a conversão de um proto-oncogene a um oncogene e, geralmente, essa conversão envolve um ganho de função em que a proteína alterada permanece constitutivamente ativada ou super-expressa e, assim, permite que as células se dividam indiscriminadamente. Os proto-oncogenes celulares podem ser classificados em diferentes grupos, baseados nas propriedades funcionais de seus produtos protéicos. Encontram-se entre os produtos codificados por essa classe de genes fatores de crescimento celular (PDGF, EGF), receptores tirosina-quinase (TSHR, RET, NTKR), proteínas transdutoras de sinal (Gs- α , RAS, BRAF) fatores de transcrição (c-MYC, c-JUN) e também proteínas reguladoras da morte celular por apoptose (BCL-2) (Silva , 2004).

Os estágios iniciais do desenvolvimento do câncer de tireóide estão relacionados com a ativação ou expressão “de novo” de vários proto-oncogenes e as alterações nos produtos desses genes estão associados com o desenvolvimento de diferentes neoplasias, que vão desde os adenomas benignos tóxicos (TSHR, Gs- α) aos carcinomas bem-diferenciados da tireóide, foliculares e papilíferos. Nos carcinomas bem-diferenciados da tireóide, alterações nos genes *BRAF*, *RET* e *RAS* são encontradas em aproximadamente 70% dos casos, raramente ocorrendo simultaneamente no mesmo tumor (Kondo *et al.*, 2006) **(FIGURA 5)**.

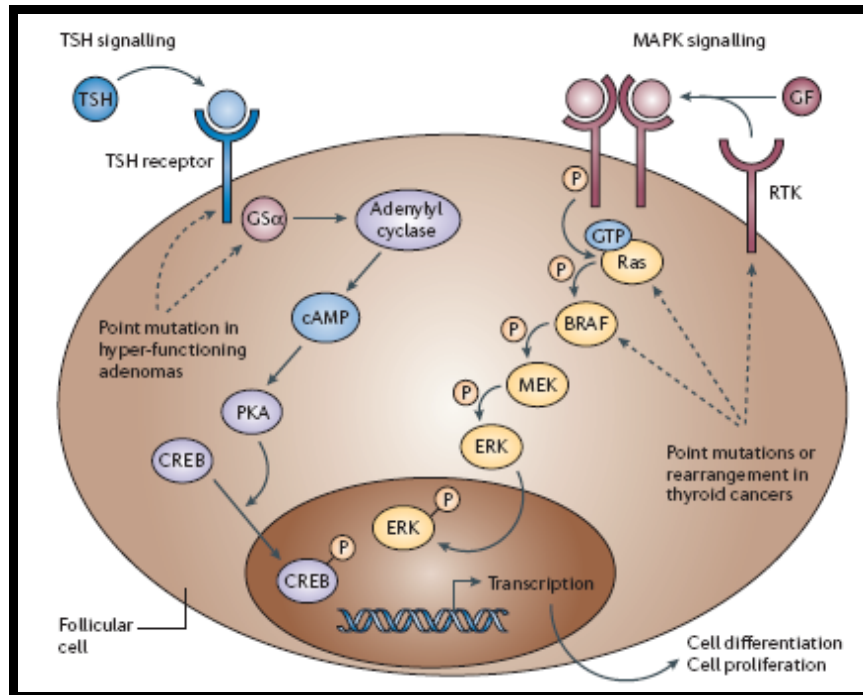


FIGURA 5 – Esquema representativo das vias de sinalização envolvidas nas neoplasias da célula folicular da tireóide. MAPK – via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos; GF – fatores de crescimento; RTK – receptor tirosina-quinase; P- radical fosfato; GTP – guanosina trifosfato; MEK – MAPK/ERK quinase; ERK - quinase regulada por sinal extracelular; TSH – hormônio estimulante da tireóide; PKA – proteína quinase A dependente de AMPc; CREB – fator de transcrição que ativa a transcrição de genes responsivos ao AMPc (Fonte: Kondo *et al.*, 2006).

4.1.1 – A VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)

A via de sinalização RAS–RAF–MEK–ERK é considerada uma via altamente conservada em eucariotos (Melillo *et al.*, 2005). Vários proto-oncogenes fazem parte dessa via, que pode ser estimulada por praticamente todos os fatores de crescimento clássicos e está hiperativa em 30% de todos os tumores humanos, incluindo os do cólon e pulmão. Essa hiperatividade tem sido associada a praticamente todos os processos funcionais próprios das células cancerosas – imortalização, proliferação independente de fator de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, habilidade de invasão e metástase, angiogênese, evasão da apoptose e até mesmo a resposta alterada a quimioterápicos. O

potencial dessa via na influência sobre esses aspectos da célula cancerosa, entretanto, pode variar, dependendo do tipo de célula ou de tumor, assim como de de outras alterações genéticas e do microambiente do tumor (Kolch *et al.*, 2002).

A ligação de fatores de crescimento a seus receptores na membrana nuclear leva à auto-fosforilação em resíduos de tirosina do domínio intracelular e dimerização desses receptores. As tirosinas fosforiladas atuam como sinais de ancoragem para moléculas de sinalização e, dependendo do resíduo de tirosina fosforilado e do complexo de sinalização associado a esse, vias de sinalização diferentes podem ser ativadas a partir desse ponto. O resíduo de tirosina Tyr1062 fosforilado, por meio do recrutamento do complexo Grb2/SOS (Grb2 - proteína ligadora do receptor de fator de crescimento / SOS - fator estimulador da troca de GDP por GTP), leva à ativação das quinases RAS, RAF, MEK e ERK. A proteína RAS libera o GDP e liga-se ao GTP, ficando ativa e sofrendo uma mudança conformacional que a possibilita ligar-se a outros efetores da cascata, como a proteína RAF, com a qual se liga com alta afinidade. A proteína RAF é então recrutada do citoplasma para a membrana celular, onde é ativada em múltiplos passos, que envolvem a desfosforilação de sítios inibitórios (que mantêm a proteína no estado inativo) pela fosfatase 2A (PP2A), assim como a fosforilação de sítios ativadores pelas quinases PAK3, quinases da família Src e outras ainda não conhecidas. O que se tem é uma cooperação entre esses agentes envolvidos na ativação da proteína RAF, para ajustar o nível de ativação apropriado ao estímulo recebido. A proteína RAF ativada fosforila e ativa a proteína MEK (MAPK/ERK quinase) em 2 resíduos de serina no domínio-quinase, e a MEK quinase ativada fosforila e ativa ERK (quinase regulada por sinal extracelular). A proteína ERK ativada tem muitos substratos no citoplasma, mas pode migrar para o núcleo controlando a expressão de genes através da ativação de vários fatores de transcrição que estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular, como C-MYC e ELK1 (Kolch *et al.*, 2002, Maciel *et al.*, 2005).

4.1.1.1 – O Gene *RET* e seu produto

O gene *RET* está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q11.2) e contém 21 exons que ocupam mais de 60kb do DNA genômico. Esse gene codifica um receptor glicoprotéico transmembrana com atividade tirosina-quinase que durante a embriogênese se expressa nas células uro-genitais e nos tecidos derivados da crista neural, incluindo o sistema nervoso e tecidos neuro-endócrinos.

A estrutura do receptor RET é similar aos receptores tirosina-quinase (RTK) em geral, sendo composto por 3 domínios: o domínio extra-celular que promove a associação com o ligante e possui uma região rica em cisteína, o domínio transmembrana hidrofóbico e o domínio intra-celular, que apresenta a região tirosina-quinase. A única diferença está no domínio extracelular, que no RET apresenta quatro repetições em *tandem* com homologia à caderina. A proteína RET apresenta três variantes geradas por “*splicing*” alternativo da região região 3’ que codifica sua porção carboxi-terminal – RET 9, RET 43 e RET 51 – curta, média e longa, sendo as variantes RET 9 e RET 51 as mais abundantes (**FIGURA 6**). Quatro ligantes desse receptor já foram identificados: o fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia (GDNF), neurturina, persefina e artemina (Manié *et al.*, 2001; Maciel *et al.*, 2005).

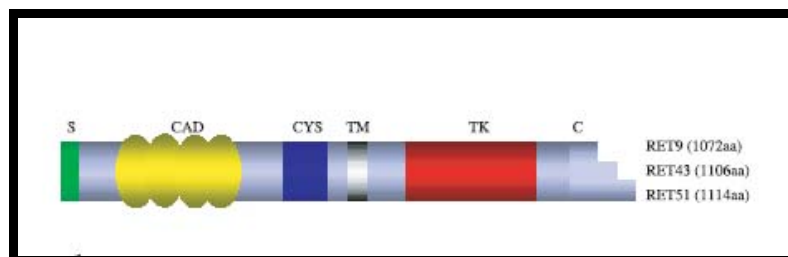


FIGURA 6 – Esquema representativo da estrutura da proteína RET. CAD – repetições de região com homologia à caderina, CYS – região rica em cisteína, S – seqüência sinal, TM – domínio transmembrana, TK - domínio tirosina-quinase, C - porção carboxi-terminal mostrando as três isoformas geradas por *splicing alternativo* (Fonte: modificado de Kodama *et al.*, 2005).

Embora exista mais de um modelo proposto para a ativação do RET, o modelo em *trans* parece fornecer explicações mais plausíveis. Neste modelo, a ativação do RET por ligantes parece ocorrer via proteínas ligadoras de membrana, incluindo a família de co-receptores para GDNF (GFRa-1 e GFRa-2), que funcionam como um domínio de ligação ao ligante, do complexo ligante-receptor. A ativação do receptor RET resulta em dimerização e auto-fosforilação dos resíduos tirosina-quinase intracelulares, iniciando-se a transdução de sinal induzida pelo RET ativado, que pode ocorrer através de diferentes vias de sinalização, dependendo do resíduo de tirosina que foi fosforilado (**FIGURA 7**) (Learoyd *et al.*, 2000; Manié *et al.*, 2001). Entre essas vias incluem-se a das quinases reguladas por sinais extracelulares ou ERK (também conhecida por MAP quinase 1 e 3), a via da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), a via MAPK p38 e C-JUN quinase (JNK, também conhecida como MAP quinase 8) (Kondo *et al.*, 2006).

O receptor RET foi o primeiro receptor tirosina-quinase identificado na etiologia do câncer de tireóide. Mutações pontuais, com ganho de função, no proto-oncogene *RET* levam ao desenvolvimento do carcinoma medular da tireóide (MTC), das células C, que pode ocorrer de forma esporádica (mutações somáticas) ou de forma familiar (mutações na linhagem germinativa), integrando ou não síndromes de neoplasias endócrinas múltiplas (MEN2A e MEN2B). Nas células foliculares rearranjos gênicos do gene *RET* induzem a formação do carcinoma papilífero da tireóide (Gimm, 2001) (**FIGURA 7**).

A síndrome MEN2 foi o primeiro exemplo relatado de uma síndrome hereditária de câncer transmitida através da linhagem germinativa de um oncogene predominantemente ativado. As células C, derivadas da crista neural, expressam o gene *RET* durante a fase embrionária, mas este não se expressa nas células C normais durante a vida adulta. Embora tenham sido relatadas duplicações, inserções e deleções no gene *RET*, mais de 90% dos pacientes das síndromes MEN2 possuem mutações germinativas pontuais nesse gene e o fenótipo

observado da doença é fortemente relacionado com o tipo de mutação encontrado. Dois principais grupos de mutações germinativas pontuais no gene *RET* são encontrados no MTC não-esporádico. O primeiro grupo engloba as mutações no domínio extracelular, que ocorrem principalmente em resíduos de cisteína específicos, resultando em dimerização e auto-fosforilação do receptor independentemente da presença de ligante. Essas mutações ocorrem principalmente nos pacientes MEN2A e nos MTC familiares. Os pacientes MEN2B, em sua maioria, são portadores de mutações no domínio tirosina-quinase, o que leva à auto-fosforilação do receptor mesmo na ausência de dimerização do mesmo. Variantes polimórficas do gene *RET* exibem um efeito modificador sobre a idade em que a síndrome MEN2A se manifesta e especula-se que exerçam esse efeito por alterarem a expressão da proteína RET mutada (Santoro *et al.*, 2004).

A ativação constitutiva do receptor RET no PTC decorre de rearranjos cromossômicos somáticos denominados *RET/PTC*, por ocorrerem exclusivamente no PTC ou carcinomas derivados desses, e constituem o segundo tipo de alterações genéticas mais comuns que ocorrem nesses tumores. Embora a célula folicular normal não apresente expressão da proteína RET, em carcinomas papilíferos é comum observar a expressão de seu domínio tirosina-quinase. Isso é explicado pelos rearranjos do gene *RET*, que promovem a fusão de sua porção 3'codificante do domínio tirosina-quinase com porções 5'de genes heterólogos não oncogênicos, mas que são largamente expressos nas células foliculares da tireóide. Como consequência, sob a influência das regiões promotoras desses genes heterólogos, as oncoproteínas quiméricas com atividade tirosina-quinase constitutiva passam a ser largamente expressas pela célula folicular, havendo dimerização desse domínio e auto-fosforilação dos resíduos de tirosina mesmo sem o estímulo de ligantes ao receptor RET. Todos os rearranjos identificados apresentam uma característica em comum, ou seja, a perda dos domínios extra-

celulares e parte do domínio transmembrana do RET (Maciel *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006).

Mais de 15 rearranjos do gene *RET* já foram descritos, no PTC esporádico e também associado à radiação, sendo o mais comum no PTC esporádico o rearranjo *RET/PTC₁*, seguido do *RET/PTC₃*. Ambos são inversões paracêntricas, ou seja, rearranjos intra-cromossômicos, já que tanto o gene *RET* quanto os outros genes estão no braço longo do cromossomo 10. O primeiro rearranjo a ser descrito, o *RET/PTC₁*, é resultante da fusão do gene *RET* com o gene chamado *H4* ou *D10S170*, responsável pela expressão de proteínas citoesqueléticas. Assim, uma seqüência de 354 pares de bases do gene *H4* substitui a região truncada do oncogene *RET*. O *RET/PTC₃*, por outro lado, é o resultado do rearranjo intracromossômico formado pela fusão dos genes *RFG* ou *ELE1* com o gene *RET* (Maciel *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006).

A ocorrência de rearranjos *RET/PTC* especificamente no PTC está bem estabelecida, mas a prevalência de tais rearranjos apresenta uma grande variabilidade entre os diversos estudos realizados, encontrando-se presentes em 3-85% dos casos. Tal diferença nos resultados encontrados pode se dever a vários fatores, como idade e localização geográfica do paciente, história prévia de exposição à radiação ionizante, assim como os diferentes métodos de detecção empregados (Kondo *et al.*, 2006).

Vários estudos têm indicado o envolvimento dos rearranjos *RET/PTC* nos estágios iniciais da patogênese do câncer de tireóide, por várias razões; entre elas o fato de haver uma alta prevalência da expressão desses rearranjos em carcinomas ocultos ou microcarcinomas subclínicos. Além disso, experimentos de superexpressão desses rearranjos em animais transgênicos levam ao desenvolvimento de um tumor com aspectos histológicos semelhantes aos do microcarcinoma papilífero. Experimentos com exposição de linhagens celulares de tireóide à radiação ionizante, principal fator de risco para o desenvolvimento do PTC, têm

evidenciado o provável envolvimento direto desse fator na indução dos rearranjos, que aparecem expressos em poucas horas (Fagin, 2004a).

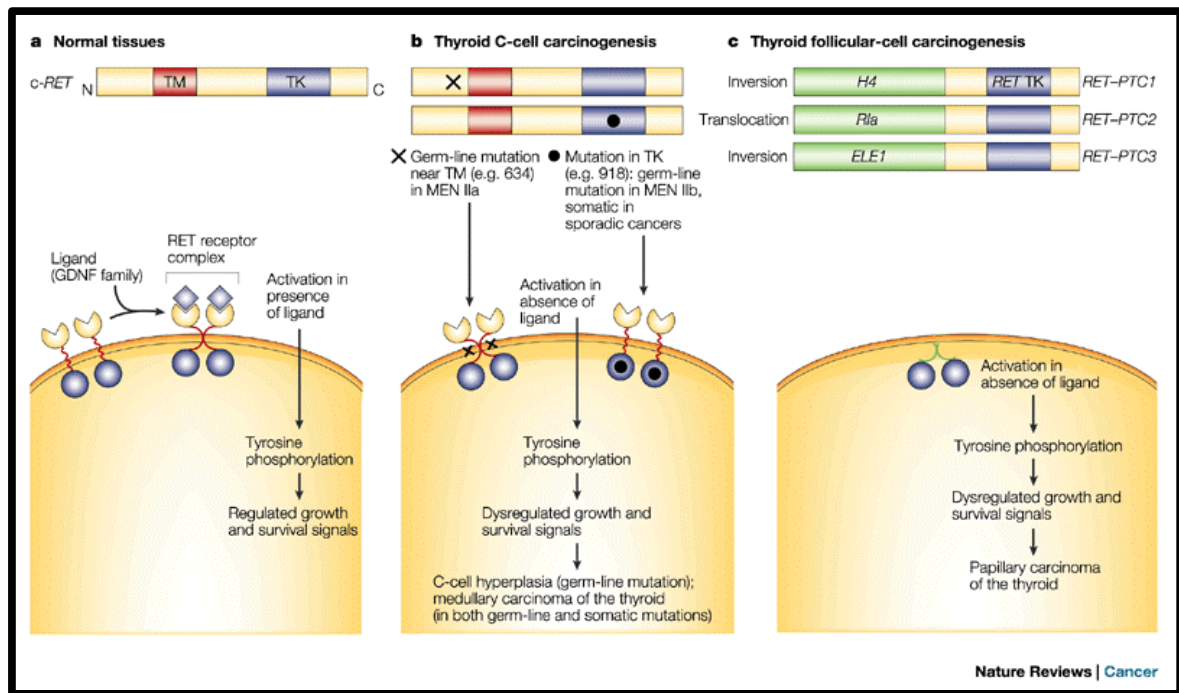


FIGURA 7 – Esquema representativo da ativação do receptor RET. **a** – gene *RET* sem alteração em tecidos normais, e receptor RET sendo ativado na presença do ligante GDNF; **b** – mutações pontuais no gene *RET* nas células C da tireóide – no domínio extracelular (X) levando à dimerização do receptor e ativação do domínio tirosina-quinase na ausência do ligante e no domínio tirosina-quinase (•) levando à auto-fosforilação na ausência de dimerização do receptor, independente da presença do ligante, havendo o desenvolvimento do carcinoma medular de tireóide esporádico e familiar ; **c** – rearranjos do gene *RET* nas células foliculares da tireóide, levando à ativação do domínio tirosina-quinase do receptor RET independente da presença do ligante e desenvolvimento do PTC. C-RET – gene do receptor RET; N- extremidade N-terminal; C – extremidade C-terminal; TM – domínio transmembrana; TK – domínio tirosina-quinase; GDNF – fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia; MEN 2A e MEN 2B – Síndromes de neoplasias endócrinas múltiplas 2A e 2B; *H4* – gene H4 do rearranjo *RET/PTC*₁; *R1a* – gene R1a do rearranjo *RET/PTC*₂; *ELE1* – gene ELE1 do rearranjo *RET/PTC*₃ (Fonte:Williams, 2002).

4.1.1.2 – O Gene *RAS* e seu produto

O *RAS* constitui uma família de três proto-oncogenes (*Ha-RAS*, no cromossomo 11p11, *Ki-RAS*, no cromossomo 12p12 e *N-RAS*, no cromossomo 1p13), cujos produtos são proteínas de 21 KDa (p21, proteína RAS). As proteínas RAS estão na porção interna da membrana citoplasmática e possuem atividade GTPase (guanosina trifosfatase), sendo conhecidas também como “pequenas” proteínas G. Podem ser encontradas sob duas formas: inativas, quando ligadas a GDP (guanosina di-fosfato) ou ativas, capazes de se ligarem ao GTP e hidrolisá-lo. Essas proteínas estão envolvidas na transdução do sinal mitogênico gerado na superfície celular pelos receptores de membrana com atividade tirosina-quinase, como o receptor RET, fazendo parte da via das MAP quinases (Moretti *et al.*, 2000, Kondo *et al.*, 2006).

Mutações pontuais no proto-oncogene *RAS* ativam constitutivamente a proteína RAS pela substituição de um único aminoácido nos códons 12 ou 61 e menos frequentemente nos códons 13 ou 59, e então a proteína adquire uma função oncogênica, gerando um fluxo contínuo e desregulado de sinais mitogênicos através de sua via de sinalização. As mutações do proto-oncogene *RAS* desempenham um importante papel na transformação maligna e na progressão de vários cânceres humanos (Suarez, 2000; Kondo *et al.*, 2006).

Em 40-50% das neoplasias tireoideanas foliculares são encontradas mutações do gene *RAS*, em praticamente todos os estágios tumorais, desde adenomas foliculares a carcinomas indiferenciados, mas entre os casos de PTC a prevalência é relativamente baixa, sendo relatada de 10-15% (Moretti *et al.*, 2000; Melillo *et al.*, 2005; Adeniran *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006). Em estudos *in vitro* e *in vivo*, de transfecção do gene *RAS* mutado em células foliculares tireoideanas, observa-se sua atividade oncogênica, com o desenvolvimento de neoplasmas de típico aspecto folicular (Fagin, 2002). Além das mutações ativadoras, acredita-se que a amplificação do gene *RAS* ou o aumento da expressão de sua proteína provocam

instabilidade genômica, propiciando o aparecimento de outras mutações que causam a progressão da transformação neoplásica. Observa-se que particularmente os carcinomas foliculares têm uma taxa muito maior de perdas alélicas, aneuploidia e aberrações cromossômicas que os carcinomas papilíferos. Tais evidências apontam para a possibilidade do oncogene *RAS* ser um gene “mutador” nas neoplasias tireoidianas e estar particularmente envolvido no desenvolvimento de tumores de arquitetura folicular da tireóide, incluindo a variante folicular do PTC (Moretti *et al.*, 2000; Fagin, 2002; Kondo *et al.*, 2006).

As mutações no gene *RAS* em tumores da tireóide são mais comuns em áreas onde existe deficiência de iodo e são raras em cânceres induzidos por radiação, o que pode ser observado entre os casos do acidente de Chernobyl (Kondo *et al.*, 2006).

O envolvimento de mutações do gene *RAS* como um evento inicial na tumorigênese tireoideana ou como fator cooperador na progressão tumoral tem sido ainda investigado, assim como sua participação na gênese de tumores papilíferos. Opiniões controversas existem, uma vez que a variação interobservadores é alta no diagnóstico diferencial entre adenomas, que são tumores benignos, e a variante folicular do PTC, que constitui tumores malignos. Além disso, a prevalência de mutações no gene *Ras* em diferentes séries de estudo difere bastante, o que pode ser atribuído às diferentes técnicas de detecção usadas e a diferenças geográficas em relação ao consumo de iodo (Kondo *et al.*, 2006).

4.1.1.3 – O Gene *BRAF* e seu produto

O gene *BRAF* (7q24), cujo nome oficial é homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino *v-raf*, codifica a proteína RAF tipo B. Essa proteína pertence à família RAF de serina/treonina-quinases, que são enzimas que modulam a função de outras proteínas pela transferência de grupamentos fosfato, sendo elas próprias ativadas por fosforilação (Pollock & Meltzer, 2002). Em mamíferos existem três isoformas das RAF quinases: A-RAF,

predominantemente encontrada em tecidos urogenitais; B-RAF (BRAF), altamente expressa em neurônios e testículos e em menores níveis nas células hematopoiéticas e na tireóide, sendo a forma mais predominante nas células foliculares e C-RAF (RAF1), que é expressa de modo ubíquo (Kolch *et al.*, 2002).

As proteínas RAF-quinases são componentes da via de sinalização das MAP quinases, sendo todas ativadas pela proteína RAS ligada a GTP. As proteínas RAF quinases ativadas fosforilam a proteína MEK quinase que prossegue com a transdução do sinal na via MAPK. Embora todas as isoformas da proteína RAF tenham a capacidade de ativar a proteína MEK quinase, a isoforma BRAF é seu ativador mais potente (Maciel *et al.*, 2005, Wojciechowska & Lewinski, 2006). Ainda que as proteínas RAF compartilhem da proteína RAS como um ativador anterior, e da proteína MEK como um substrato posterior, existem evidências de que possuam algumas funções distintas e provavelmente independentes dessa via, o que é demonstrado pela diferença de fenótipos observados em camundongos nocauteados para as três isoformas (Kolch *et al.*, 2002).

As proteínas RAF possuem uma estrutura comum, consistindo de um domínio regulatório N-terminal e um domínio quinase C-terminal. No domínio regulatório encontram-se duas regiões homólogas conservadas, onde estão os sítios de ligação à proteína RAS e o domínio rico em cisteína (CR1), além do domínio rico em serina e treonina (CR2). No domínio quinase encontra-se o segmento de ativação (CR3), requerido para a atividade da proteína RAF (**FIGURA 8**) (Kolch *et al.*, 2002).

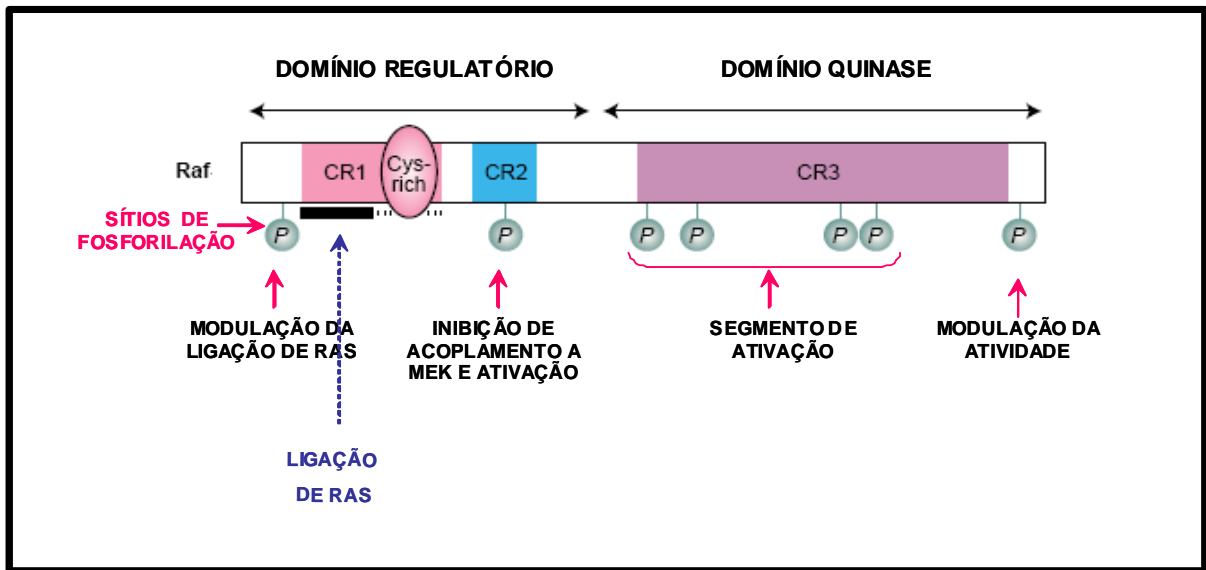


FIGURA 8 – Esquema representativo da organização das proteínas RAF quinases. CR1, CR2 e CR3 – regiões conservadas, *Cys rich* – domínio rico em cisteína. (Fonte: baseado em Kolch *et al.*, 2002).

A descoberta de mutações ativadoras no gene da proteína BRAF aumentou o número de alterações genéticas conhecidas na via das MAP quinases, confirmando a importância dessa via no desenvolvimento dos cânceres humanos. Mutações nesse gene têm sido encontradas em uma variedade de cânceres, com diferentes frequências; mas principalmente no melanoma (63-66%), carcinoma papilífero da tireóide (29-83%), carcinoma ovariano invasivo (33-40%), carcinoma colorretal (11-20%) e outros (Trovisco *et al.*, 2006).

Quase todas as mutações do gene *BRAF* estão em duas regiões no domínio quinase, a alça P ligadora de ATP, codificada pelo exon 11 e a alça de ativação codificada pelo exon 15, uma região regulatória da fosforilação que é essencial para a atividade quinase, abrigando mais de 80% dessas mutações. Na conformação inativa da proteína BRAF os resíduos G596-V600 na alça de ativação formam interações hidrofóbicas com os resíduos G464-V471 na alça “P”, resultando em uma estrutura que não liga o ATP e nem o substrato da proteína BRAF. Mutações oncogênicas nas alças de ativação e na alça P interrompem essa interação, desestabilizando a conformação inativa e havendo então a conversão da proteína para uma

forma cataliticamente ativa (Fagin, 2004b). Uma mutação pontual do tipo *missense* em que ocorre a transversão do nucleotídeo timina para adenina na posição 1799 (T1799A), levando à substituição do aminoácido valina para ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína (BRAF^{V600E}), representa 90% das mutações observadas no exon 15. Essa mutação provoca ativação constitutiva da BRAF quinase ao simular sua fosforilação no segmento de ativação quando substitui um aminoácido neutro (valina) por um aminoácido carregado negativamente em posição adjacente a um sítio de fosforilação (Xing, 2005; Trovisco *et al.*, 2006).

As mutações pontuais no exon 15 do gene *BRAF* foram recentemente consideradas como a alteração genética mais comum no carcinoma papilífero da tireóide esporádico em adultos, enquanto mutações no exon 11 desse gene não foram encontradas no câncer de tireóide, diferentemente de outros tipos de câncer (Xing, 2005; Adeniran *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006). Cerca de 30 artigos publicados na literatura nos últimos anos, referentes a pacientes adultos, com diversidade geográfica, étnica e dos subtipos histológicos dos tumores, evidenciaram a presença da mutação T1799A em 810/1856 casos de PTC (44%), 0/165 de FTC (0%), 23/94 (24%) de carcinoma anaplásico da tireóide (ATC), 0/542 (0%) de neoplasias benignas da tireóide e 0/65 (0%) de carcinoma medular de tireóide (MTC). Esses resultados demonstram uma especificidade dessa mutação, em carcinomas de tireóide, para o PTC e alguns carcinomas pouco diferenciados e ATC (possivelmente derivados de PTC), e ausência dessa mutação no FTC, nas neoplasias benignas da tireóide e no MTC (Xing, 2005).

No PTC, a mutação T1799A no *BRAF* está associada à maior ocorrência de metástases distantes, aparência papilífera característica, estágios mais avançados da doença e idade mais avançada dos pacientes. Por outro lado, não são comuns em PTC não-esporádico, relacionado a exposição à radiação. A frequência dessas mutações em ATC coexistindo com PTC é significativamente maior (60–78%) que em ATC sem o componente papilífero (0–4%), o que

sugere uma maior tendência à desdiferenciação para casos de PTC com essa mutação (Kondo *et al.*, 2006; Xing, 2005).

Em microcarcinomas papilíferos tem sido relatada a ocorrência da mutação T1799A, indicando sua ocorrência nos estágios iniciais do desenvolvimento do tumor. Parece apresentar uma prevalência variável na dependência do subtipo histológico, ocorrendo com maior frequência na agressiva variante de células altas e com menor frequência na variante folicular. (Adeniran *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006).

Outras mutações mais raras em *BRAF* também têm sido relatadas nos carcinomas da tireóide, como a transição A1802G, que resulta na substituição de uma lisina por ácido glutâmico no códon 601 da proteína ($BRAF^{K601E}$) e foi observada em poucos casos do carcinoma folicular (FTC), raramente em adenomas foliculares em 7% dos casos da variante folicular do PTC (Xing, 2005; Wojciechowska & Lewinski, 2006). A fusão dos genes *BRAF* e *AKAP9* por inversão paracêntrica do braço longo do cromossomo 7, gerando o oncogene quimérico *AKAP9/BRAF*, parece estar associado ao PTC induzido por radiação ionizante. Este rearranjo resulta na perda de dois domínios regulatórios da proteína BRAF, que exercem efeitos auto-inibitórios da atividade quinase (CR1 e CR2). O domínio CR1 abriga o sítio de ligação a RAS-GTP e sua perda resulta em um ganho de função de BRAF independente da ativação por RAS (Fusco *et al.*, 2005; Wojciechowska & Lewinski, 2006). Uma nova mutação no gene *BRAF*, a deleção de 3 nucleotídeos TGA1799-1801, leva à conversão dos códons 600 (GTG – valina) e 601 (AAA - lisina) a um único códon (GAA – ácido glutâmico), resultando na substituição da valina e lisina por ácido glutâmico ($BRAF^{VK600-1E}$). Foi relatada na variante sólida do PTC, presente apenas nas metástases para linfonodos, e não no tumor primário, o que seria indicativo de um papel facilitador dessa mutação na progressão do PTC em linfonodos (Maciel *et al.*, 2005; Wojciechowska & Lewinski, 2006).

4.2 - GENES SUPRESSORES DE TUMOR E OS TUMORES DA TIREÓIDE

Os genes supressores de tumor controlam negativamente a proliferação e a sobrevivência das células através das proteínas que codificam e, por isso, mutações deletérias da função desses genes contribuem para o desenvolvimento do câncer. Existem aproximadamente trinta genes supressores de tumor identificados, relacionados a proteínas que atuam nos *checkpoints* celulares inibindo a progressão do ciclo celular caso o DNA esteja danificado, assim como a proteínas que promovem apoptose e a enzimas envolvidas no reparo do DNA.

Diferentemente dos proto-oncogenes, nos quais as mutações ativadoras são dominantes, as mutações inativadoras para a maioria dos genes supressores de tumor são recessivas, ou seja, somente afetam a função desses genes quando atingem os dois alelos. A inativação dos genes supressores de tumor é freqüentemente causada por mutações pontuais em um alelo acompanhadas por deleção do outro alelo. Essa segunda lesão pode envolver um grande número de nucleotídeos, produzindo o fenômeno chamado de perda de heterozigose (LOH). Alterações na expressão gênica por mecanismos epigenéticos como a metilação da região promotora dos genes supressores de tumor, em uma ou ambas as cópias, podem ser tão prejudiciais quanto alterações na seqüência codificante do DNA. Um outro mecanismo envolvendo esses genes e que contribui para a progressão tumoral é a haploinsuficiência, onde a perda de função de apenas um alelo é responsável pela tumorigênese, mesmo quando o outro alelo selvagem é mantido. Provavelmente os níveis haplóides do produto codificado não são suficientes para inibir os estímulos da proliferação celular, ou a mutação em um alelo atua por um efeito dominante negativo, como nos proto-oncogenes (Silva, 2004).

Na carcinogênese tireoideana a perda de heterozigose ocorre mais freqüentemente em tumores foliculares do que nos papilíferos, sendo uma distinção molecular importante entre

esses dois tipos histológicos mais frequentes de carcinomas da tireóide. Em tumores foliculares a perda de heterozigose ocorre principalmente no cromossomo 11, banda q13, e no braço curto dos cromossomos 3 e 17 (Moretti *et al.*, 2000).

Entre os fatores que regulam a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular incluem-se os fatores de progressão, como as ciclinas D1 e E1 e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs); e os fatores de competição ou inibidores de CDKs, que atuam como supressores de tumor e incluem a proteína do retinoblastoma (RB) e as proteínas p16, p21, p27 e p53. Mudanças no padrão de expressão dessas proteínas regulatórias podem alterar o controle do ciclo celular, contribuindo para a transformação maligna e progressão tumoral. A diminuição da expressão dos inibidores de CDKs tem sido relatada em diversas neoplasias, incluindo as da tireóide e esse fenômeno provavelmente está associado às diferentes taxas de proliferação celular observadas entre os carcinomas da tireóide bem-diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados. Em relação à proteína p21 sabe-se que 13% dos casos de PTC apresentam deleções no gene que a codifica, e que ocorre perda progressiva dessa proteína no PTC à medida que o estágio do tumor avança. Mutações pontuais no gene da p16 são raras em tumores da tireóide, porém a perda de heterozigose na região desse gen 9p21 é frequente no FTC (27%) e em carcinomas indiferenciados (50%). A metilação de ilhotas CpG na porção 5'desse gene está presente em 30% das neoplasias da tireóide. O padrão de expressão da proteína do retinoblastoma em tumores benignos e malignos ainda é controverso, já tendo sido relatada uma frequência de mutações em torno de 55% dos tumores analisados, mas esses achados necessitam ainda ser confirmados. Pode-se ainda citar uma diminuição da expressão do inibidor de CDK p27 no PTC, sobretudo em formas metastáticas ou mais agressivas. A proteína p53 também apresenta mutações em carcinomas da tireóide pouco diferenciados e em carcinomas anaplásicos (Moretti *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2006).

4.2.1 - O GENE *TP53* E SEU PRODUTO

O *TP53* é um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) em humanos. Contém 11 exons, sendo o primeiro exon não codificante, e codifica uma fosfoproteína nuclear tetramérica de 53 KDa que atua como um fator de transcrição. Esse gene pertence a uma família de genes altamente conservados que contém ao menos dois outros membros, *TP63* e *TP73* (Guimarães & Hainaut, 2002). As alterações genéticas mais freqüentes em cânceres humanos são as mutações encontradas no *TP53*, que são detectadas em mais de 50% de todos os tipos de câncer, e tornam a proteína p53 funcionalmente inativa. Nos tumores nos quais não se encontra mutação no gene *TP53*, acredita-se que a proteína p53 não esteja normalmente funcionante, por distúrbios em sua regulação ou por interações proteína-proteína (Latonen & Laiho, 2005).

A proteína p53 possui 393 aminoácidos e organiza-se como a maioria dos fatores de transcrição, em regiões estruturais e funcionais interdependentes funcionalmente, apesar de apresentarem propriedades específicas. Esses domínios correspondentes a domínios conservados do gene *TP53* incluem dois domínios de ativação transcricional (resíduos 20-40 e 40-60) e um domínio regulatório rico em prolina (resíduos 60-90) na porção N-terminal; um domínio central de ligação ao DNA seqüência-específica (resíduos 100-300); e um domínio de oligomerização (resíduos 320-360) e um domínio multifuncional regulatório (resíduos 364-393) C-terminais (**FIGURA 9**) (McKinney & Prives, 2005).



FIGURA 9 - Esquema da organização da proteína p53, com suas regiões estruturais e funcionais e a numeração aproximada dos códons correspondentes a cada região. TAD – domínios de ativação transcricional (Fonte: Baseado em McKinney & Prives, 2005).

Ambos os domínios de ativação transcricional são requeridos para que a proteína p53 exerça sua atividade de transativação perfeitamente. Possuem sítios de interação para a proteína de ligação ao TATA box e para o fator de transcrição basal TFIID, além de também interagirem com a proteína MDM2, reguladora negativa do gene *TP53*. O domínio rico em prolina contém sítios envolvidos em interações proteína-proteína nas vias de transdução de sinal, sendo uma região importante na ativação da apoptose dependente de p53. O domínio central da proteína contém a região de ligação ao DNA, que ocorre de um modo seqüência-específico. Encontra-se nessa região a maioria das mutações do gene *TP53* em tumores, o que evidencia a importância da mesma para a função supressora de tumor da p53. Esse domínio também contém sítios de ligação ao íon zinco, requerido para a manutenção da estrutura conformacional da p53 e sua ligação ao DNA. O domínio de oligomerização é o responsável pela apresentação da p53 na forma de tetrâmeros, que ocorre com a formação de dímeros de dímeros. O domínio regulador na porção C-terminal é altamente básico e capaz de interagir com o DNA de uma maneira não seqüência-específica, reconhecendo principalmente danos na molécula de DNA. Contém muitos sítios de ubiquitinação e de modificação como fosforilação e acetilação induzidas por *stress*. Sua ausência promove um aumento na ligação específica da p53 ao DNA, o que evidencia seu papel regulador negativo. Propõe-se que essa região seja responsável pela manutenção do estado “latente” da p53 (McKinney & Prives, 2005).

A proteína p53 desempenha um papel central na resposta celular adaptativa e protetiva ao estresse. Sob condições normais é expressa constitutivamente em todos os tecidos, estando na forma latente, mas alguns tipos de estímulos podem levar rapidamente à sua ativação e acúmulo na célula pela indução de modificações pós-traducionais, como fosforilação e acetilação. Esses sinais incluem formas de estresse genotóxico (dano no DNA causado por agentes químicos ou físicos, como radiação UV, raios X e γ , carcinógenos químicos e drogas

citotóxicas) e de estresse não-genotóxico (ativação constitutiva de cascatas de sinalização do crescimento celular ou estresse oncogênico, depleção de ribonucleotídeos e hipóxia). Esses estímulos podem levar à ativação de cascatas envolvendo proteínas-quinases com domínios fosfatidil-inositol 3-quinase, como ATM, ATR, DNA-PK e quinases regulatórias do ciclo celular, como Chk2. Essas quinases fosforilam a p53 em vários locais, ativando-a. Uma vez ativada, a p53 vai exercer vários efeitos anti-proliferativos determinados de acordo com a intensidade do dano, incluindo principalmente os efeitos no ciclo celular, no reparo do DNA e na indução de apoptose em caso de dano irreparável ao DNA (**FIGURA 10**) (Guimarães & Hainaut, 2002; Latonen & Laiho, 2005).

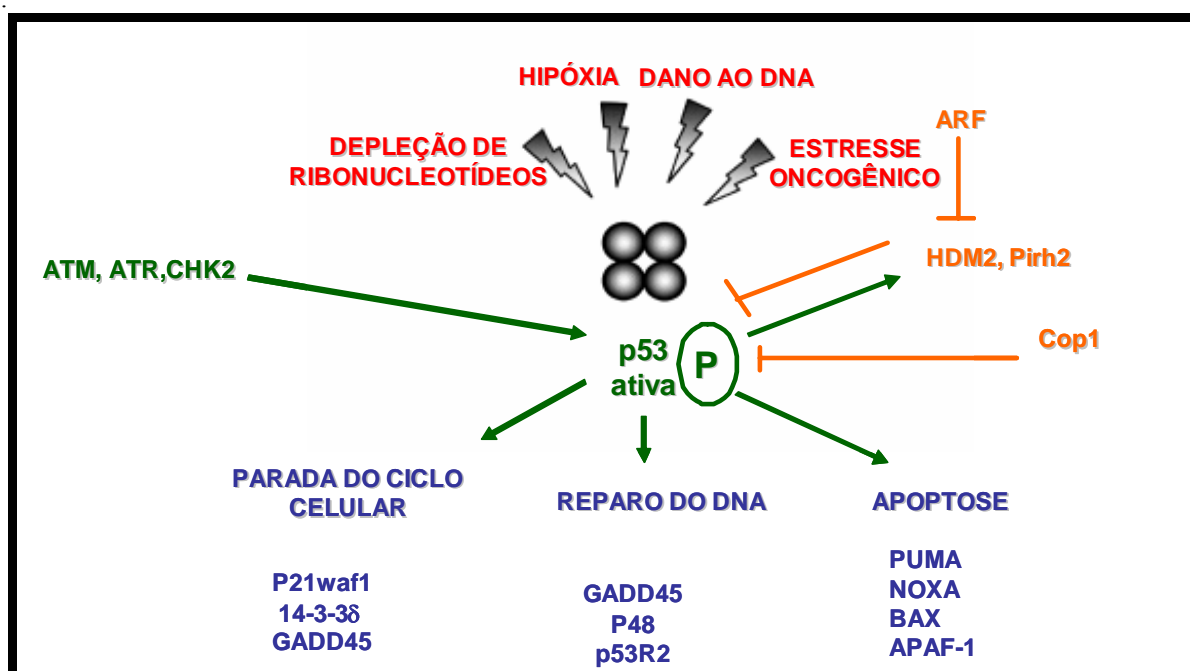


FIGURA 10 - Esquema mostrando classes de sinais de estresse celular que induzem à ativação da p53 por fosforilação e os efeitos supressores de tumor desencadeados, além da regulação da p53 por HDM2 e outras proteínas inibitórias da p53. ATM, ATR e CHK2 – proteínas-quinases que fosforilam a p53; HDM2, Pirh2 e Cop 1 – proteínas inibitórias da p53; ARF – proteína inibidora da ligação da p53 com HDM2; P – fosforilação; p21^{WAF1/CIP1}, 14-3-3 *sigma*, GADD45, P48, p53R2, Bax, PUMA, NOXA, APAF-1 – proteínas envolvidas nos

efeitos desencadeados pela p53, como parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose; setas verdes – ativação; setas laranjas – inibição. (Fonte: Baseado em Guimarães & Hainaut, 2002; Latonen & Laiho, 2005).

O mecanismo pelo qual a p53 regula esses processos é principalmente por ativação ou repressão transcricional de vários genes codificantes de proteínas que participam dos mesmos, mas pode atuar também por interações diretas tipo “proteína-proteína”. Uma enorme lista de efetores que podem ser ativados ou reprimidos estão envolvidos nas vias de sinalização envolvidas, podendo variar de uma célula para outra, dependendo da natureza e intensidade do sinal indutor, do tecido e do grau de diferenciação celular (**FIGURA 10**) (Guimarães & Hainaut, 2002; Latonen & Laiho, 2005).

A p53 promove a parada do ciclo celular principalmente em G1, sendo seu alvo transcricional mais importante para esse efeito a proteína p21^{WAF1/CIP1}, um potente inibidor de várias quinases dependentes de ciclinas. Na fase S a p21^{WAF1/CIP1} também pode atuar provocando o bloqueio da fase de alongamento da replicação do DNA. Ao promover a parada do ciclo celular, a p53 favorece o reparo do DNA. Na fase G2 a p53 também pode atuar, mas principalmente através da indução dos genes de *14-3-3 sigma* e *GADD45*.

No reparo do DNA a p53 regula a transcrição de genes-alvo dos vários sistemas e também interage diretamente com componentes da maquinaria de reparo, contribuindo na manutenção da estabilidade genética. Possui atividade exonuclease 3'-5' intrínseca no domínio de ligação ao DNA, ligando-se ao DNA lesado e DNA simples fita. Recentemente foi relatado o envolvimento da p53 promovendo relaxamento da cromatina e facilitando o acesso dos fatores de reparo às lesões do DNA causadas por radiação UV. Caso o DNA não possa ser reparado convenientemente, induz a transcrição de genes codificantes de proteínas envolvidas no processo de apoptose, levando à morte programada da célula.

A habilidade da p53 de induzir apoptose pode ser sua mais importante função supressora de tumor. Promove apoptose induzindo a transcrição de vários genes que

contribuem tanto para vias apoptóticas do receptor de morte (*Fas/APO1*, *KILLER/DR5*) ou mitocondriais (*Bax*, *PUMA*) e de genes que suprimem sinais de sobrevivência (*IGF-BP3*). Adicionalmente reprime a expressão de genes anti-apoptóticos ou que promovem a sobrevivência (*IGF-receptor 1*, *Bcl-2*, *survivin*). Os genes ativados na apoptose são determinados pelo tipo celular envolvido e também pelo tipo de estímulo desencadeador do dano ao DNA. A p53 pode ainda promover apoptose de forma não-dependente da transcrição, através de proteínas relacionadas à permeabilidade da membrana mitocondrial. A habilidade em participar de várias rotas apoptóticas tem sido considerado importante para a função supressora de tumor da p53 (Latonen & Laiho, 2005).

A proteína *Murine/Human double minute 2* (MDM2/HDM2) é o principal regulador da p53. Ligando-se à mesma e atuando como uma ubiquitina E3-ligase, promove sua autopolibiquitinação e também a da p53, havendo posterior degradação proteossômica de ambas. Adicionalmente a MDM2 também se liga ao domínio de transativação da p53 bloqueando sua função como fator de transcrição. Essa regulação do nível e da atividade da p53 é finamente controlada, uma vez que a transcrição da proteína MDM2 é induzida pela p53, havendo então um mecanismo de *feedback* negativo entre ambas (**FIGURA 10**).

Por esse mecanismo, em células que não estão sob condições de estresse, a p53 é mantida em baixos níveis, tendo uma meia-vida considerada muito curta, em torno de 5-20 minutos, permitindo que a proliferação celular ocorra. Sob situações de estresse, entretanto, os sítios de ligação de p53 com MDM2 são fosforilados, havendo a dissociação desse complexo e a p53 acumula-se na célula, exercendo seus efeitos supressores de tumor, como parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. Outras proteínas podem estar envolvidas alterando a interação p53 - MDM2, como a proteína ARF, que sob estímulos oncogênicos se liga a MDM2, impedindo que haja ubiquitinação e degradação da p53 via MDM2.

Recentemente duas outras E3 - ligases para p53 foram identificadas: Pirh2 e Cop1,

ambas promovendo ubiquitinação e degradação da p53 independentemente de MDM2. Assim como a MDM2, Pirh2 também é um gene-alvo da p53, sendo possivelmente a formação de uma alça regulatória entre ambas (Morgunkova, 2005; Latonen & Laiho, 2005).

As mutações mais frequentemente encontradas no gene *TP53* são mutações pontuais do tipo *missense* (75%), ou seja, que levam à troca de um aminoácido na proteína codificada. A maior parte dessas mutações ocorre no domínio de ligação ao DNA (97%), levando a uma perda da capacidade da p53 de se ligar ao DNA e exercer suas funções como fator de transcrição. Embora o gene *TP53* seja sem dúvida um gene supressor de tumor, que classicamente apresentam mutações com efeito recessivo, observa-se o fenômeno da haploinsuficiência predispondo à transformação neoplásica. Acredita-se que a p53 mutante possa exercer um efeito dominante negativo ao interagir com a p53 produzida pelo alelo selvagem ou que possa apresentar um ganho de função, como os oncogenes, estimulando, por exemplo, a transcrição de genes como o *MDR1*, relacionado à resistência a múltiplas drogas. As mutações do gene *TP53* podem ser germinativas, sendo estas responsáveis pela maioria das síndromes de câncer familiares conhecidas como síndrome de Li-Fraumeni; ou somáticas. A proteína alterada é frequentemente expressa em altos níveis nos tumores, devido ao fato da p53 não-funcionante não poder induzir a transcrição da MDM2, sua principal reguladora, e conseqüentemente se acumula no núcleo da célula. Portanto uma alta expressão da p53 é considerada uma evidência indireta de que se encontra não-funcionante (Guimarães & Hainaut, 2002; Wahl *et al.*, 2005).

Enquanto as mutações inativadoras da p53 são freqüentes nos cânceres humanos, no câncer de tireóide têm sido relatadas em apenas 10% dos casos, sobretudo nos tipos histológicos mais agressivos (22–88% nos carcinomas indiferenciados e 0–9% nos carcinomas bem-diferenciados). Por não serem freqüentes nos carcinomas bem-diferenciados da tireóide, as mutações do *TP53* têm sido consideradas como eventos mais tardios na

carcinogênese tireoideana, provavelmente favorecidas pela instabilidade genômica crescente durante a progressão tumoral, e parecem ser um ponto crucial de bloqueio da progressão de tumores indolentes para letais, como evidenciado pelas mutações quase restritas a lesões agressivas (Kanaseki *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2006; Malaguarnera *et al.*, 2007).

Estudos em grandes séries de tumores da tireóide sugerem que embora a p53 não esteja mutada, sua atividade pode estar inibida por outros mecanismos. De fato observa-se uma expressão aumentada de p53 (50%) não só no ATC, onde as mutações são frequentes, mas também em tumores bem diferenciados, mesmo sem mutação, observando-se nesses casos pior prognóstico (Almudevar *et al.*, 2000; Horie *et al.*, 2001; Malaguarnera *et al.*, 2007). Vários mecanismos independentes podem constituir hipóteses para explicar a inativação da p53 selvagem nos carcinomas da tireóide, agindo sobre a proteína e/ou suas vias de sinalização, incluindo a retenção citoplasmática da p53, superexpressão da MDM2 e interação com isoformas com função dominante negativa dos membros da família p53 ($\Delta Np73a$ and $TAp63a$). Esses mecanismos podem estar envolvidos tanto em estágios iniciais da transformação da célula tireoideana quanto na progressão tumoral e resistência à quimioterapia (Malaguarnera *et al.*, 2007).

Um polimorfismo no domínio rico em prolina do exon 4 do gene *TP53*, que produz uma mudança do aminoácido arginina para prolina no códon 72 da proteína p53, tem sido relatado como associado a uma susceptibilidade no desenvolvimento do tumor de tireóide, uma vez que a variante polimórfica produzida tem uma menor habilidade que a proteína p53 selvagem em ativar a apoptose. Indivíduos com o genótipo pro/pro têm um risco aumentado mais de sete vezes de desenvolver o câncer de tireóide, comparado aos outros genótipos; o que pode ser responsável pelas variações geográficas na incidência do câncer de tireóide (Granja *et al.*, 2004).

II- OBJETIVOS

O modelo sugerido para a carcinogênese da tireóide, baseado em observações clínicas, histológicas e moleculares, propõe vias de sinalização específicas envolvidas na proliferação neoplásica maligna das células foliculares tireoideanas, incluindo os carcinomas bem-diferenciados do tipo papilífero (PTC). Defeitos genéticos dos proto-oncogenes *RET* e *BRAF*, que resultam na ativação constitutiva da via das MAP quinases, são eventos freqüentes nos estágios iniciais da carcinogênese do PTC, podendo estar associados à exposição a fatores de risco, como a radiação. Alguns carcinomas indiferenciados (ATC) são considerados derivados de carcinomas bem-diferenciados pré-existentes, através de eventos genéticos adicionais, incluindo a inativação e acúmulo da proteína supressora de tumor p53.

Portanto, a fim de averiguar a importância da ativação oncogênica da via das MAP quinases e da inativação da proteína supressora de tumor p53 na patogênese molecular e progressão tumoral em carcinomas papilíferos da tireóide e suas variantes, provenientes de Hospitais do Estado do Rio de Janeiro e de São Paulo, o presente trabalho tem por objetivos:

⇒ determinar a freqüência da mutação T1799A do gene *BRAF* em fragmentos de tumores da tireóide de carcinomas papilíferos e suas variantes, incluindo o PTC clássico, a variante folicular e a variante esclerosante difusa; assim como em carcinomas anaplásicos;

⇒ determinar a freqüência de mutações nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*, em fragmentos de tumores da tireóide considerados mais agressivos em termos histológicos, ou seja, os mais indiferenciados, incluindo a variante esclerosante difusa do PTC e o ATC;

⇒ analisar a expressão da proteína p53 em fragmentos de tumores da tireóide considerados mais agressivos em termos histológicos, ou seja, os mais indiferenciados, incluindo a variante esclerosante difusa do PTC e o ATC;

⇒ correlacionar os resultados obtidos nas análises moleculares com dados clínico-patológicos dos casos estudados, além de comparar os resultados obtidos com os dados descritos na literatura.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 – MATERIAL

1.1 - TUMORES DE TIREÓIDE

Fragmentos de tumor de tireóide foram obtidos de pacientes portadores de câncer de tireóide submetidos a tireoidectomia no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), no Hospital Gaffrée e Günle (HUGG), da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os fragmentos de tumor obtidos no HUPE, HUCFF e Hospital das Clínicas da UNICAMP foram imediatamente congelados em Nitrogênio líquido após cirurgia e posteriormente armazenados a -80°C (tecido tireoideano “fresco”). Os fragmentos de tumor obtidos no Hospital Gaffrée e Günle foram fixados em formol e incluídos em parafina (tecido tireoideano arquivado), fazendo parte do acervo do Departamento de Patologia, tendo sido cedidos para este estudo pelo Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira.

Foram selecionados para este estudo 33 casos (20 do HUPE, 2 do Hospital das Clínicas - UNICAMP, 1 do HUCFF e 10 do HUGG) cujos diagnósticos histológicos foram de Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC) e suas variantes (subtipos histológicos) ou de Carcinoma Anaplásico da Tireóide (ATC). Dos 33 casos estudados, 32 corresponderam a tumores primários da tireóide e apenas o caso 17Am correspondeu a um tumor metastático de tireóide em linfonodos pré-traqueais. Em 25 dos 33 casos os diagnósticos histológicos foram confirmados pelo patologista Dr. Carlos Alberto Basílio.

Para a obtenção dos dados clínico-patológicos dos pacientes foram realizadas análises de seus prontuários nos hospitais de origem, exceto os casos do Hospital Universitário Gaffrée e Günle, cujas informações foram obtidas pelas análises dos laudos do Departamento de Patologia.

Vale ressaltar que este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do HUPE, sendo realizado de acordo com as normas do mesmo.

2 - MÉTODOS

A metodologia utilizada na detecção de mutações no gene *TP53* e no gene *BRAF* nos pacientes com câncer de tireóide englobou técnicas como: extração do DNA genômico, PCR (exons 5, 6, 7 e 8 do *TP53* e exon 15 do *BRAF*), Polimorfismo de Conformação de DNA de Fita Simples (SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*), purificação e seqüenciamento do produto de PCR.

2.1 - EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO TIREOIDEANO

2.1.1 – EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO TIREOIDEANO FRESCO

Fragmentos de aproximadamente 0,1 g de tumor de tireóide foram macerados em 1,2 mL de solução de digestão (NaCl 100 mM, EDTA 25 mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e SDS 0,5%) e foram acrescentados 10 µL de proteinase K a 10 mg/mL. As amostras foram então incubadas por 12 a 16 horas a 57°C e centrifugadas a 20800 g por 10 minutos (centrífuga EPPENDORF modelo 5417C). O sobrenadante foi transferido para novo tubo e a este foram adicionados 300 µL de NaCl saturado. Após centrifugação de 5 minutos a 15300 g,

o sobrenadante foi transferido para novo tubo e foi adicionado 3 vezes o seu volume de etanol absoluto. Então, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% (para a retirada do excesso de sal), seco à temperatura ambiente e solubilizado em aproximadamente 500 µL de tampão TE (Tris - HCl 10 mM, EDTA 1 mM - pH 8,0) (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.2 – EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO TIREOIDEANO ARQUIVADO

Foram utilizados cortes de 10 µm de espessura do bloco de parafina contendo o tecido tumoral para a extração do DNA genômico. Os cortes obtidos foram desparafinizados ao serem submetidos ao seguinte tratamento: xileno por 5 minutos, etanol 100% por 3 minutos, etanol 95% por 3 minutos, etanol 70% por 3 minutos e água destilada por 3 minutos.

Depois de desparafinado, cada fragmento de tecido tumoral foi macerado em 50 µL de tampão TE, e o volume foi completado com este tampão até 270 µL. Foram adicionados 30 µL de SDSK (SDS 10% e proteinase K 0,5%) e após homogeneização em agitador de tubos os tecidos foram incubados por aproximadamente 72 horas a 57°C, com adição de 30 µL de SDSK a cada 24 horas. Após esta etapa, as amostras foram submetidas à temperatura de 100°C por 10 minutos (Termociclador MJ 100) e foi adicionado um volume igual de mistura de uma parte de clorofórmio com uma parte de fenol tamponado com Tris - HCl 100 mM pH 8,0. Após 15 segundos de agitação em agitador de tubos, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 17900g. A fração aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 1/10 de seu volume em acetato de sódio 3 M, 2,5 vezes seu volume de etanol e 2 µL de solução de glicogênio 20 mg/mL. Após homogeneização as amostras foram mantidas a - 20°C por 12 - 16 horas e centrifugadas por 15 minutos na velocidade de 17900 g a 7°C (centrífuga EPPENDORF modelo 5417 R). O precipitado resultante foi lavado com 500µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado

e o precipitado (contendo o DNA genômico), depois de seco à temperatura ambiente, foi solubilizado em 50 µL de tampão TE.

2.2 - QUANTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO

Após a extração de DNA de tecido tireoideano fresco, uma alíquota foi diluída cerca de 100 vezes e o DNA foi quantificado através da absorvância medida em 260 nm (detecção de ácidos nucleicos) e 280 nm (detecção de proteínas) em espectrofotômetro (SHIMADSU Modelo UV-160A). A razão entre A_{260} e A_{280} deve ser igual ou maior a 1,75 - indicando a pureza do material (Sambrook *et al.*, 1989). Então, a concentração de DNA foi calculada através da expressão matemática:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ DO}_{260} \quad - \quad 50 \text{ } \mu\text{g/mL de DNA} \\ \text{Solução DNA DO}_{260} \quad - \quad \underline{X} \end{array}$$

$$\underline{X} \times \text{diluição} = \text{concentração do DNA} (\mu\text{g/mL})$$

Foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo 0,2 µg/mL em tampão TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM - pH 8,0), a fim de verificar a qualidade do DNA genômico extraído dos tumores frescos e arquivados (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram misturadas com tampão de aplicação concentrado 6x (azul de bromofenol 0,25 %, xileno cianol 0,25 %, glicerol 50 %) e a eletroforese foi realizada em cuba horizontal (GIBCO BRL – HORIZON 58), a 3,5 V/cm por aproximadamente 30

minutos. O DNA foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20) e as imagens dos géis foram registradas pelo sistema Kodak Digital Science 1D e arquivadas.

2.3 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (*Polymerase Chain Reaction* – PCR)

A reação de PCR foi usada para amplificar regiões específicas do DNA genômico utilizando-se pares de oligonucleotídeos apropriados para a amplificação das regiões de interesse (exons 5 a 8 do gene *TP53* e exon 15 do gene *BRAF*).

2.3.1 - AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS 5, 6, 7 E 8 DO GENE *TP 53*

A presença de mutações nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53* foi estudada nos tumores considerados mais agressivos em termos histológicos, ou seja, os mais indiferenciados (4 anaplásicos e 5 papilíferos da variante esclerosante difusa).

Para a amplificação dos DNAs extraídos de tumores arquivados, foi utilizada a estratégia de *nested* - PCR. Esta técnica compreende a amplificação do fragmento da região de interesse em duas etapas. Na primeira etapa utiliza-se um par de oligonucleotídeos que flanqueia a região de interesse (PCR externa). O produto amplificado obtido é reamplificado na segunda etapa com um par de oligonucleotídeos que se ligam mais internamente (PCR interna). A utilização deste recurso visa aumentar a especificidade e rendimento do produto amplificado.

A mistura reacional para a PCR externa foi composta por: 2,5 µL de tampão de PCR 10 x (Tris-HCl 75 mM pH 9,0, KCl 50 mM e (NH₄)₂SO₄ 20 mM - BIOTOOLS), 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM (BIOTOOLS), 0,5 U de *Tth* DNA polimerase (BIOTOOLS), 2 µL de mistura a 2 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - AMERSHAM), 7,5 pmols de cada oligonucleotídeo (IDT, Inc; **TABELA 4**), 1 µL da solução de DNA (tecido arquivado) e um

volume suficiente de água ultra-pura estéril para completar 25 µL de volume final. A mistura reacional para a PCR interna foi composta por 5 µL de tampão de PCR 10 x, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 U de *Tth* DNA polimerase, 4 µL de mistura a 2 mM de dNTPs, 15 pmols de cada oligonucleotídeo (IDT,Inc; **TABELA 4**), 2 µL do produto da PCR externa e um volume suficiente de água ultra-pura estéril para completar 50 µL de volume final. As amplificações para as PCRs externas e internas foram realizadas no termociclador PTC-100 (MJ Research, INC), e as condições de ciclagem foram: 5 minutos a 94°C (pré-desnaturação), 35 ciclos (PCR externa) ou 25 ciclos (PCR interna) - cada um consistindo em três etapas - desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e um ciclo adicional de extensão de 10 minutos a 72°C.

Os DNAs extraídos dos tumores frescos foram amplificados em apenas uma etapa, com as condições de ciclagem e os oligonucleotídeos da PCR externa. A mistura reacional foi composta por 5 µL de tampão de PCR 10 x, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 U de *Tth* DNA polimerase, 4 µL de mistura a 2 mM de dNTPs, 15 pmols de cada oligonucleotídeo, aproximadamente 200 ng de DNA e um volume suficiente de água ultra-pura estéril para completar 50µL de volume final.

2.3.2 - AMPLIFICAÇÃO DO EXON 15 DO GENE *BRAF*

A análise da mutação T1799A do exon 15 do gene *BRAF* foi realizada em todos os tumores estudados.

A mistura reacional foi composta por: 5 µL de tampão de PCR 10 x, 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 U de *Tth* DNA polimerase, 4 µL de mistura a 2 mM de de dNTPs(dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmols de cada oligonucleotídeo (IDT,Inc; **TABELA 5**), aproximadamente 200 ng de DNA (tecido fresco) ou 1 a 3 µL de solução de DNA (tecido arquivado), e um

volume suficiente de água ultra-pura estéril para completar 50 µL de volume final. A reação de amplificação foi realizada no termociclador PTC - 100 e as condições de ciclagem foram: 5 minutos a 94°C (pré-desnaturação), 35 ciclos - cada um consistindo em três etapas - desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e um ciclo adicional de extensão de 10 minutos a 72°C.

TABELA 4 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação (PCR) para a identificação de mutações nos exons 5 a 8 do gene *TP53*.

Exon(<i>TP53</i>)	Fragmento(tamanho)	Primer	Seqüência
5	Externo (310 pb)	236 Senso	5' TGTTCACTTGTGCCCTGACT 3'
		270 Anti-Senso	5' AGCAATCAGTGAGGAATCAG 3'
	Interno (248 pb)	312 Senso	5' TTCAACTCTGTCTCCTTCCT 3'
		271 Anti-Senso	5' CAGCCCTGTCTCTCTCCAG 3'
6	Externo (224 pb)	234 Senso	5' TGGTTGCCCCAGGGTCCCCAG 3'
		256 Anti-Senso	5' CGGAGGGCCACTGACAACCA 3'
	Interno (181 pb)	239 Senso	5' GCCTCTGATTCTCTCACTGAT 3'
		240 Anti-Senso	5' TTAACCCCTCCTCCCAGAGA 3'
7	Externo (237 pb)	333 Senso	5' CTTGCCACAGGTCTCCCCAA 3'
		313 Anti-Senso	5' AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA 3'
	Interno (177 pb)	237 Senso	5' AGGCGCACTGGCCTCATCTT 3'
		238 Anti-Senso	5' TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC 3'
8	Externo (313 pb)	314 Senso	5' TTGGGAGTAGATGGAGCCT 3'
		320 Anti-Senso	5' AGAGGCAAGGAAAGGTGATA 3'
	Interno (231 pb)	316 Senso	5' TTCCTTACTGCCTCTTGCTT 3'
		319 Anti-Senso	5' AGGCATAACTGCACCCTTGG 3'

TABELA 5 – Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação (PCR) para a identificação de mutações no exon 15 do gene *BRAF* (Salvatore *et al.*, 2004).

Fragmento(tamanho)	Primer	Seqüência
224 pb	BRAF DNA ex 15 Senso	5' TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA 3'
	BRAF DNA ex 15 Antisenso	5' GGCCAAAAATTTAATCAGTGGAA 3'

2.4 – VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDOS DO GENE *TP53* E DO GENE *BRAF* POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose 1,5 % com brometo de etídeo 0,2 µg/mL em tampão TAE 1x foi realizada para analisar os produtos de PCR obtidos, tanto dos exons 5 a 8 do gene *TP53* quanto do exon 15 do gene *BRAF*.

Foram analisados no gel 5 µL do produto de amplificação obtido, com o auxílio de um padrão de peso molecular (Gene Ruler TM 50 bp DNA Ladder - Fermentas). As amostras foram misturadas com tampão de aplicação concentrado 6x e após aplicação das mesmas no gel de agarose, deu-se início à eletroforese em cuba horizontal (GIBCO BRL – HORIZON 58), a 3,5 V/cm por aproximadamente 20 minutos. O DNA foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo TM-20) e as imagens dos géis foram registradas pelo sistema Kodak Digital Science 1D e arquivadas.

2.5 - POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES (*Single Strand Conformation Polymorphism* – SSCP) DOS EXONS 5-8 DO GENE *TP53* E DO EXON 15 DO GENE *BRAF*

Esse método permite detectar, por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, alterações no padrão de migração de DNA simples fita que podem corresponder a mutações na molécula de DNA. A fita simples de DNA forma estruturas secundárias ao migrar no gel e uma simples troca de base, uma deleção ou inserção é suficiente para que ocorra uma mudança na mobilidade do fragmento de DNA em estudo (Orita *et al.*, 1989). Foi utilizado tanto para analisar os exons 5 a 8 do gene *TP53* quanto o exon 15 do gene *BRAF*.

Após a amplificação do DNA, um volume de 1 a 6 μL do produto de PCR foi desnaturado com solução desnaturante (formamida 95 %, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,25 % e xileno cianol 0,25 %) na proporção de 1:2. Essa mistura foi submetida à temperatura de 94°C em termociclador PTC - 100 por 10 minutos e imediatamente colocada no gelo por cerca de 5 minutos. Posteriormente aplicou-se a mesma em gel de poliacrilamida não-desnaturante 8 % (Sambrook *et al.*, 1989).

A eletroforese para os fragmentos de PCR correspondentes aos exons 5-8 do gene *TP53* foi realizada à temperatura de aproximadamente 20°C, em sala refrigerada, durante aproximadamente 18 horas em voltagem constante de 3,7 V/cm, com tampão TBE 1 x em cuba de eletroforese vertical (modelo V16-2 - LIFE TECHNOLOGIES). Para o fragmento de PCR correspondente ao exon 15 do gene *BRAF* a eletroforese foi realizada à temperatura de aproximadamente 10°C, mantida por refrigerador; e o tempo foi de aproximadamente 24 horas, sendo as outras condições mantidas.

2.6 - COLORAÇÃO POR PRATA

Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em solução fixadora (ácido acético 10 %) por 20 minutos e, posteriormente, lavado duas vezes por dois minutos com água destilada. Adicionou-se 200 mL de solução de coloração de nitrato de prata (nitrato de prata 0,1 % e formaldeído P.A. 0,15 % v/v) por 30 minutos. Após uma nova lavagem de 10 segundos, com água destilada, o gel foi imerso em 200 mL de solução reveladora (carbonato de sódio anidro 3 %, tiosulfato de sódio 0,0002 % e formaldeído P.A. 0,15 % v/v) até ser possível visualizar o aparecimento de bandas. Após a revelação, o gel foi incubado novamente na solução fixadora para interromper o processo de revelação e colocado para secar entre duas folhas de papel celofane, sendo assim arquivado (Bassam *et al.*, 1991).

2.7 - SEQÜENCIAMENTO

O seqüenciamento foi realizado com as amostras que apresentaram um padrão anormal de mobilidade eletroforética no gel de SSCP nas análises realizadas para detecção de mutações dos exons 5 a 8 do gene TP53 e do exon 15 do gene BRAF. Os tumores anaplásicos do HUPE foram seqüenciados para os exons 5 a 8 de TP53, independentemente de terem apresentado padrão anormal de mobilidade eletroforética no SSCP, com exceção do T1, porque não havia mais material desse tumor.

2.7.1 - PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Os produtos de PCR a serem seqüenciados foram purificados utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (PROMEGA). Este sistema permite que o fragmento de DNA seja purificado diretamente da reação de PCR ou após eletroforese, através da excisão

de um fragmento de gel de agarose contendo a banda de interesse (no caso da reação de PCR ter originado produtos inespecíficos).

No caso da purificação ter sido feita diretamente da reação de PCR, a primeira etapa consistiu em adicionar a aproximadamente 100 μL de produto de PCR obtido um igual volume de *Membrane Binding Solution* (contida no kit). No caso do produto de PCR ter sido submetido a eletroforese em gel de agarose a 1 % contendo brometo de etídeo 0,2 $\mu\text{g/mL}$, em tampão TAE 1 x, cortou-se a banda de interesse com o auxílio de visualização em transiluminador de luz ultravioleta e após pesagem da mesma, adicionou-se um volume correspondente de *Membrane Binding Solution*, na proporção de 1 μL desta solução para 1 mg de gel e incubou-se a 65°C por 10 minutos ou até que a banda de gel tenha sido completamente dissolvida. A partir de então as etapas seguintes foram iguais para ambos os casos. Foi preparado então um tubo coletor com uma coluna e a mistura de *Membrane Binding Solution* e produto de PCR foi incubada na mesma por 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugou-se então a 20800 g por 1 minuto e descartou-se o líquido sobrenadante contido no tubo coletor, retornando-se a coluna para o mesmo tubo coletor. A coluna foi então lavada com 700 μL de *Membrane Wash Solution* (contida no kit) através de centrifugação por 1 minuto e após descartado o sobrenadante nova lavagem foi feita, agora com 500 μL da *Membrane Wash Solution* e centrifugação por 5 minutos a 20800 g. Uma nova centrifugação então foi feita, por 1 minuto a 20800 g, com a tampa da centrífuga aberta, com o intuito de evaporar algum etanol residual (contido na *Membrane Wash Solution*). Após essa centrifugação a coluna foi cuidadosamente transferida para um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 50 μL de *nuclease-free water* (contida no kit) diretamente no centro da coluna. Incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se a 20800 g por 1 minuto. A coluna foi então descartada e o produto de PCR purificado eluído da mesma foi quantificado em gel de agarose a 1,5 %, contendo brometo de etídeo 0,2 $\mu\text{g/mL}$, em tampão TAE 1 x, com

o auxílio de padrão de peso molecular (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder - Fermentas) e posteriormente armazenado a -20° C para posterior seqüenciamento. A imagem destes géis foram registradas pelo sistema Kodak Digital Science 1D e arquivadas.

2.7.2 - REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

As amostras foram seqüenciadas pela Plataforma de seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, no Sequenciador 48 - capilar ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) e as reações de seqüenciamento foram feitas baseadas nas informações concedidas pela plataforma.

A quantidade de produto de PCR purificado a ser colocada na reação variou de acordo com o tamanho do fragmento: de 100 - 200 pb colocou-se de 1 - 3 ng de fita molde, e de 200 - 500 pb colocou-se de 3 - 10 ng de fita molde. Foram adicionados ainda 3,2 pmols de oligonucleotídeo (para cada amostra foram feitas duas reações - uma no sentido senso e outra no sentido antisenso) e um volume suficiente de água ultra-pura estéril para completar 7,5 µL de volume final. Os tubos com esse conteúdo foram encaminhados aos técnicos responsáveis pelo recebimento dos formulários de pedidos de seqüenciamento na plataforma, juntamente com as fotos dos géis de agarose com os produtos de PCR purificados e estes finalizavam a reação com ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems), na Fiocruz.

2.8 – IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p53

A análise da expressão da proteína p53 foi feita por imunohistoquímica nos tumores considerados mais agressivos em termos histológicos, ou seja, os mais indiferenciados

(anaplásicos, com exceção do T1; papilíferos da variante esclerosante difusa). Esta etapa do trabalho foi realizada no Hospital Universitário Gaffrée e Güinle.

A coloração foi feita da seguinte forma: cortes de 5 µm (em lâminas) dos blocos de parafina contendo os tumores foram desparafinizados com xileno e depois etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 95 % e etanol 70 %) e hidratados com água destilada. As lâminas com os tecidos tumorais foram então tratadas com H₂O₂ 3 %, lavadas com água destilada e incubadas com uma solução de recuperação antigênica - *Target Retrieval Solution* 1x (DAKO), por 40 minutos, a 98°C. Após atingirem a temperatura ambiente, foram tratadas com BSA 1 % (SIGMA) por 20 minutos e depois por 12 - 16 horas com o anticorpo monoclonal primário anti-p53 CLONE/KLON DO-7 na diluição de 1:100 (DAKO) em câmara úmida a 4°C. Após atingirem a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem - *Wash Buffer* 1x (Ortho Clinical Diagnosis, Novocastra), coradas utilizando o Kit Ultrastreptavidin HRP AEC Detection Kit (Signet™ Laboratories) e contracorados com Hematoxilina de Harris. A coloração castanha na região nuclear foi considerada positiva para a expressão da proteína p53 e as células contadas para se obter uma porcentagem aproximada de células positivas. As lâminas coradas foram analisadas pelo Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira e o resultado foi categorizado de acordo com a quantidade relativa de núcleos corados observados, variando de negativo (-), fracamente positivo (+), positivo (++) a fortemente positivo (+++).

IV - RESULTADOS

1 - CARACTERÍSTICAS DOS CASOS ESTUDADOS

Neste estudo, foram analisados 33 casos de câncer de tireóide de indivíduos submetidos a tireoidectomia, sendo 20 casos provenientes do HUPE, 2 do Hospital das Clínicas (Campinas), 1 do HUCFF e 10 do HUGG. Todos os diagnósticos histológicos foram de Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC) e suas variantes ou de Carcinoma Anaplásico da Tireóide (ATC). A distribuição dos pacientes por diagnóstico histológico foi de 5 casos de ATC (15,2%), 18 de PTC clássico (54,5%), 3 da variante folicular do PTC (9,1%) e 7 da variante esclerosante difusa do PTC (21,2%). Todas as variantes de PTC somadas respondem por 84,8% dos casos estudados (FIGURA 11).

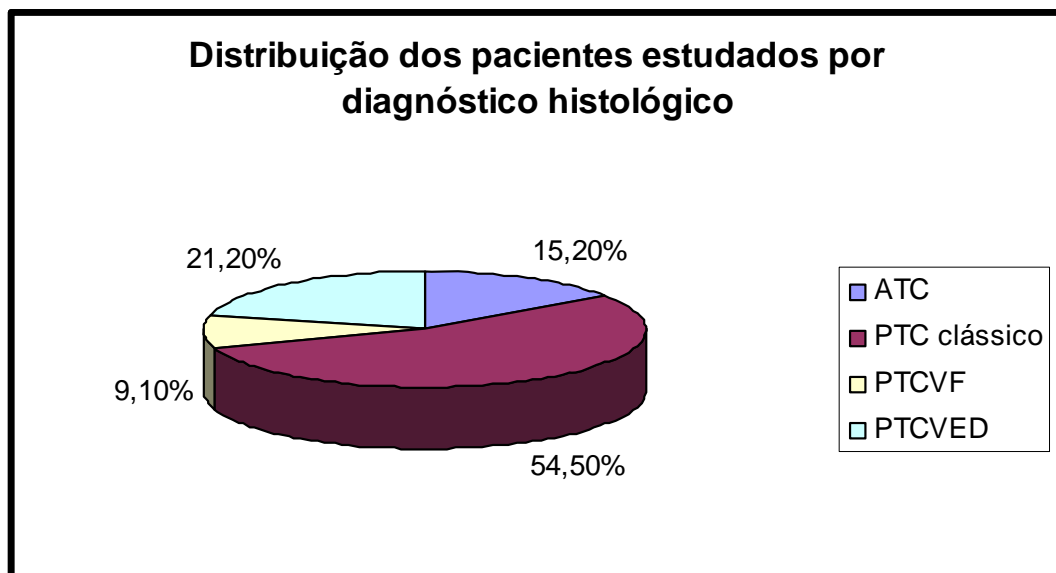
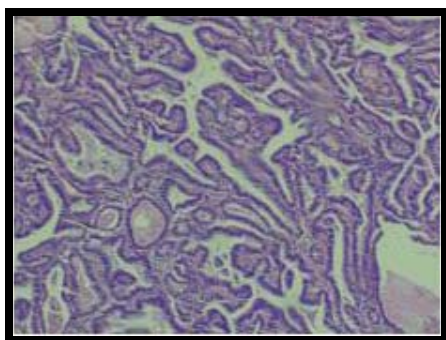


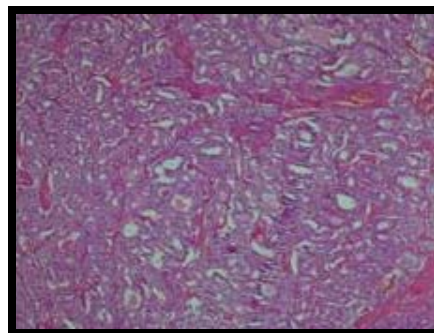
FIGURA 11 – Perfil de distribuição dos pacientes estudados por diagnóstico histológico. ATC – carcinoma anaplásico da tireóide; PTC –carcinoma papilífero da tireóide; PTCVF- variante folicular do carcinoma papilífero da tireóide; PTCVED – variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero da tireóide.

Neste trabalho os tumores classificados como papilíferos clássicos (PTCc) apresentavam o padrão clássico de arquitetura papilífera, com projeções papilares formadas de pedículos fibrovasculares recobertos por epitélio; além dos aspectos morfológicos nucleares característicos. Os casos classificados como variante folicular do carcinoma papilífero (PTCVF) são compostos predominantemente ou exclusivamente de folículos com células que mantêm os aspectos nucleares característicos do PTC. A variante esclerosante difusa do PTC (PTCVED) tem morfologia característica, apresentando os diferentes componentes estruturais do PTC, com fibrose extensa e muitos corpos psamomatosos (*vide* capítulo da Introdução).

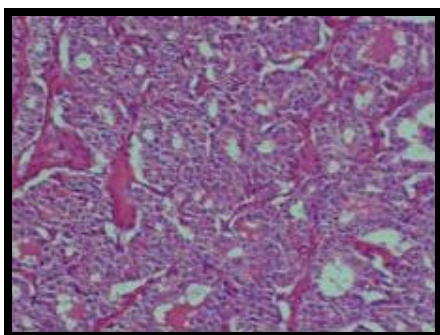
A **FIGURA 12** apresenta fotomicrografias de tumores analisados neste trabalho, corados com hematoxilina – eosina, representando cada tipo histológico estudado.



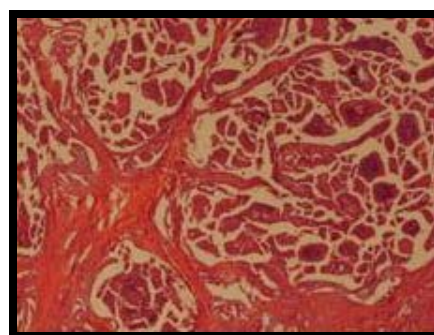
A - PTCc



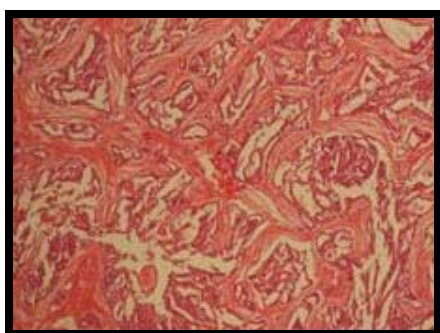
B - PTCVF



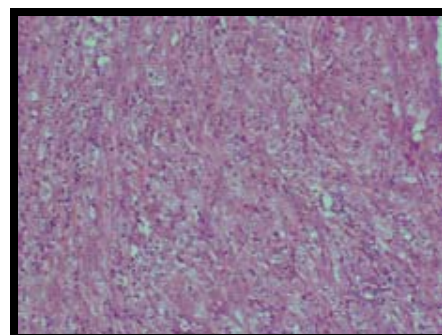
C - PTCVF



D - PTCVED



E - PTCVED



F - ATC

FIGURA 12 – Fotomicrografias de tumores analisados neste trabalho, corados com hematoxilina-eosina, representando cada tipo histológico. A – PTC Clássico – tumor T91, aumento original 100x; B e C – PTC variante folicular – tumor T14, aumento original 40x e 100x, respectivamente; D e E – PTC variante esclerosante difusa – tumores 2A e T14, respectivamente, aumento original 20x; F – Carcinoma anaplásico – tumor T2, aumento original 100x.

A idade média observada entre os pacientes foi de $46,0 \pm 16,7(17-72)$, sendo a média dos casos de ATC de $66,6 \pm 5,3(61-72)$ e entre o PTC em geral de $41,4 \pm 14,7(17-71)$. Já entre os casos de PTC clássico foi de $42,9 \pm 13,2(19-70)$, PTC var fol de $43,7 \pm 8,1(38-53)$ e PTC var ED de $35,6 \pm 21,9(17-71)$. Não foi possível obter a idade de 6 pacientes (6 casos de PTCc).

Quanto à distribuição em gênero, as mulheres representaram 84,8% dos casos estudados, enquanto os homens representaram 15,2%; sendo observada uma razão entre o número de mulheres de homens de 5,6 (28 mulheres para 5 homens). Por tipo histológico observa-se que as mulheres representaram 100% dos casos de ATC e de PTCVF, 85,7% dos casos de PTCVED, 77,8% do PTC clássico e 82,1% dos casos de PTC em geral (FIGURA 13).

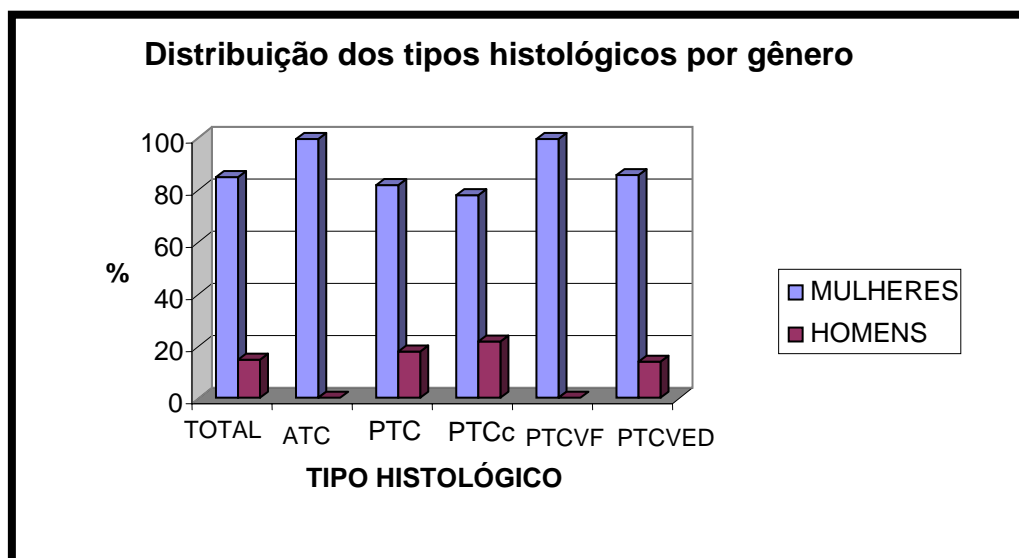


FIGURA 13 – Perfil de distribuição dos pacientes estudados por gênero, no total de casos e para cada tipo histológico. ATC – carcinoma anaplásico da tireóide; PTC – todas as variantes do carcinoma papilífero da tireóide; PTCc – carcinoma papilífero da tireóide clássico; PTCVF- variante folicular do carcinoma papilífero da tireóide; PTCVED – variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero da tireóide.

Em relação às características fisiopatológicas dos casos estudados, os dados obtidos pela consulta aos prontuários médicos e laudos da patologia estão apresentados na **TABELA 6**, que mostra um resumo dos dados referentes aos pacientes e aos tumores.

TABELA 6 – Resumo das características fisiopatológicas dos casos estudados, com características dos pacientes e dos tumores. A – tumor arquivado, NT – não tem o dado, F – feminino, M – masculino, BMNA – bócio multinodular adenomatoso, MET – tumor metastático.

Tumor	Origem	Diagnóstico	Idade/ Gênero	Metástase	Características do tumor	Doença progressa da tireóide
1	HUPE	ATC	68 -F	NT	NT	NT
2	HUPE	ATC	71 - F	NT	NT	NT
3	HUPE	PTCc	19 -M	NT	NT	NT
5	HUPE	PTCc	37 - F	NT	invasão da cápsula, aderido à traquéia	BMNA
10	HUPE	PTCc	47-M	NT	NT	BMNA
12	HUPE	PTCVF	38-F	ausente	NT	BMNA;hipotireoidismo
14	HUPE	PTCVF	53-F	NT	não invasivo à cápsula	NT
15	HUPE	ATC	72-F	NT	NT	Doença de Graves/ supressão de TSH
19	HUPE	PTCc	43-F	NT	não invasivo à cápsula	hipertireoidismo
20	HUPE	ATC	61-F	NT	NT	NT
23	HUPE	PTCc	60-F	NT	invasão de tecc periféricos	NT
24	HUPE	ATC	61-F	NT	NT	Doença de Graves/ supressão de TSH
25	HC	PTCc	47-F	NT	NT	NT
26	HC	PTCc	36-F	NT	NT	NT
37	HUCFF	PTCc	40-F	NT	NT	NT
40	HUPE	PTCc	47-M	linfonodos	invasão vascular	NT
48	HUPE	PTCVF	40-F	linfonodos	NT	BMNA
55	HUPE	PTCc	25-F	linfonodos	infiltração do tecido adiposo	NT
65	HUPE	PTCc	F	ausente	NT	NT
77	HUPE	PTCc	70-F	NT	NT	BMNA; hipotireoidismo
91	HUPE	PTCc	45-F	NT	NT	NT
92	HUPE	PTCc	53-F	linfonodos	NT	BMNA
97	HUPE	PTCc	32-F	NT	invasão da cápsula, aderência à musculatura	NT
1A	HUGG	PTCVED	17-F	linfonodos e pulmão	invasão vascular	Tireoidite de Hashimoto
2A	HUGG	PTCVED	71-F	linfonodos e pulmão	invasão da gordura regional, músculos, venosa e linfática	Tireoidite de Hashimoto
3A	HUGG	PTCVED	22-F	linfonodos	extensa fibrose e infiltrado linfocitário	NT
5A	HUGG	PTCVED	F	NT	invasão vascular	NT
6A	HUGG	PTCVED	F	NT	infiltrado linfocitário, esclerose e calcificação	NT
7A	HUGG	PTCc	M	linfonodos	invasão vascular e da musculatura	NT
11A	HUGG	PTCVED	42-M	linfonodos e pulmão	invasão linfática e vascular, infiltrado linfocitário	NT
14A	HUGG	PTCVED	26-F	linfonodos e pulmão	invasão vascular e linfática, infiltrado linfocitário	NT
17AMET	HUGG	PTCc	F		NT	NT
20A	HUGG	PTCc	F	NT	invasão vascular, tumor com áreas sólidas	NT

2 - ANÁLISE DE MUTAÇÕES DO GENE *BRAF*

A análise da mutação T1799A do exon 15 do gene *BRAF* foi realizada em todos os tumores estudados, frescos e arquivados (os tumores arquivados estão identificados pela letra A) pela técnica de PCR-SSCP. Os tumores que apresentaram padrões de mobilidade eletroforética alterados no SSCP foram seqüenciados para a confirmação da presença de mutações no exon 15 do gene *BRAF*. A **TABELA 7** apresenta os resultados dessa análise, assim como os resultados obtidos anteriormente pela análise dos rearranjos *RET/PTC*.

Entre todos os tumores analisados 27,3% apresentaram a mutação T1799A no exon 15 do gene *BRAF*. Entre os tumores papilíferos essa mutação está presente em 32,1% dos casos, entre os papilíferos clássicos em 38,9%, entre os papilíferos da variante folicular em 0% dos casos e entre tumores da variante esclerosante difusa em 28,6% dos casos. Nenhum dos casos de ATC apresentou a mutação T1799A.

A figura **FIGURA 14** ilustra a análise do exon 15 do gene *BRAF* por PCR-SSCP, em gel de acrilamida 8%, e o eletroferograma obtido por seqüenciamento automático mostrando a presença da mutação T1799A em um dos alelos do tumor T5. A seta indica o fragmento de DNA com migração alterada correspondente à mutação estudada.

TABELA 7 – Resultados da análise da mutação T1799A no gene *BRAF* e da presença dos rearranjos *RET/PTC*₁ e *RET/PTC*₃. ATC – carcinoma anaplásico da tireóide, PTCVF – variante folicular do carcinoma papilífero da tireóide, PTCVED – variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero da tireóide. NR – não realizado.

Caso	Diagnóstico	Mutação BRAF	Rerranjos RET/PTC
		T1799A	
T1	ATC	NEG	NR
T2	ATC	NEG	RET/PTC ₃
T15	ATC	NEG	RET/PTC ₃
T20	ATC	NEG	NEG
T24	ATC	NEG	NEG
T3	PTCc	NEG	NEG
T5	PTCc	POS	RET/PTC ₃
T10	PTCc	NEG	RET/PTC ₃
T19	PTCc	NEG	RET/PTC ₁
T23	PTCc	POS	NEG
T25	PTCc	NEG	NEG
T26	PTCc	NEG	NEG
T37	PTCc	NEG	NEG
T40	PTCc	NEG	RET/PTC ₁ e RET/PTC ₃
T55	PTCc	NEG	RET/PTC ₁ e RET/PTC ₃
T65	PTCc	POS	NEG
T77	PTCc	POS	NEG
T91	PTCc	POS	RET/PTC ₁
T92	PTCc	POS	NEG
T97	PTCc	POS	NEG
T7A	PTCc	NEG	NR
T17Am	PTCc	NEG	NR
T20A	PTCc	NEG	NR
T12	PTCVF	NEG	RET/PTC ₃
T14	PTCVF	NEG	NEG
T48	PTCVF	NEG	NEG
T1A	PTCVED	NEG	NR
T2A	PTCVED	NEG	NR
T3A	PTCVED	NEG	NR
T5A	PTCVED	NEG	NR
T6A	PTCVED	NEG	NR
T11A	PTCVED	POS	NR
T14A	PTCVED	POS	NR

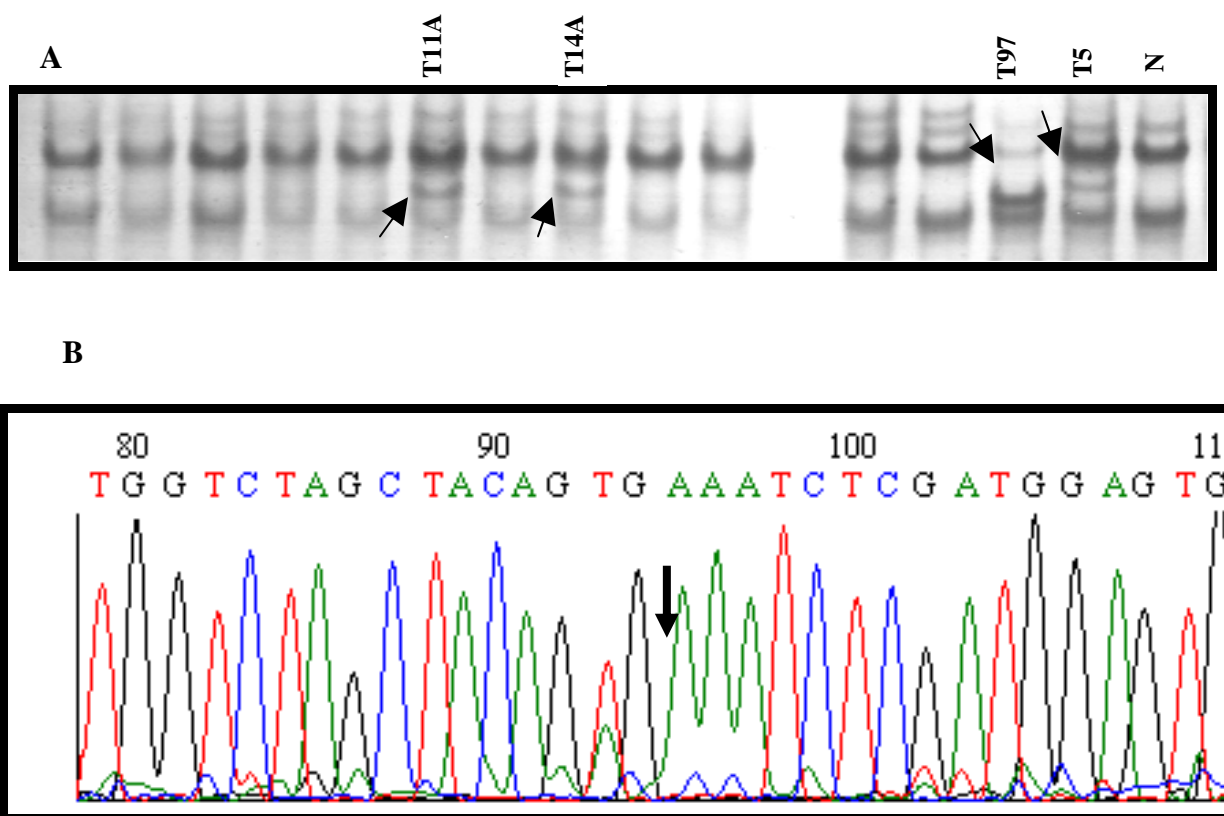


FIGURA 14 – **A** – Imagem representativa da análise do exon 15 do gene *BRAF* por PCR-SSCP em gel de acrilamida 8%. As setas indicam padrões de migração eletroforética alterados, correspondentes à presença de mutação nos tumores T11A, 14A, T97 e T5. N – fragmento de DNA sem a mutação T1799A. **B** - Imagem de eletroferograma mostrando a presença da mutação T1799A em um dos alelos do tumor T5. A seta mostra a posição da mutação.

3 - ANÁLISE DOS REARRANJOS *RET/PTC₁* E *RET/PTC₃* (ANEXO 1 – Artigo em preparação)

Nos tumores de tireóide provenientes das biópsias frescas foi realizada a análise da presença dos rearranjos *RET/PTC₁* e *RET/PTC₃* do gene *RET*, assim como da expressão do domínio tirosina-quinase (TK-RET), através da técnica de RT-PCR, por Valéria Regina de Moura Castro, em nosso laboratório e a metodologia, assim como parte dos resultados obtidos estão descritos no artigo em preparação“ ***RET* proto-oncogene activation in Brazilian thyroid carcinomas**”. Foi possível detectar a presença do rearranjo *RET/PTC₁* em 18,2% dos

tumores analisados, *RET/PTC₃* em 31,8%, e de ambos os rearranjos ocorrendo simultaneamente em 9,1%. Somando-se a ocorrência dos dois rearranjos verifica-se que estão presentes em 41% dos tumores analisados.

Em dois tumores estudados foram observados simultaneamente rearranjos *RET/PTC* e a mutação T1799A, como mostra a **TABELA 7**: o tumor T5, com o rearranjo *RET/PTC₃* e o tumor T91 com o rearranjo *RET/PTC₁*.

4 - ANÁLISE DE MUTAÇÕES DO GENE *TP53* (ANEXO 2 – Artigo em preparação)

A presença de mutações nos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53* foi estudada nessa série de casos nos tumores considerados mais agressivos em termos histológicos, ou seja, os mais indiferenciados – anaplásicos e papilíferos da variante esclerosante difusa.

Os DNAs extraídos dos tumores frescos foram amplificados em apenas uma etapa, enquanto os de tumores arquivados foram amplificados em 2 etapas - PCR externa e PCR interna; e os tamanhos dos fragmentos obtidos confirmados em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos de PCR obtidos dos tumores anaplásicos foram purificados e seqüenciados diretamente, enquanto os fragmentos de PCR obtidos dos tumores papilíferos da variante esclerosante difusa foram submetidos a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida não desnaturante (SSCP).

Os tumores anaplásicos estudados - T1, T2, T15, T20 e T24 foram obtidos de biópsias cirúrgicas “frescas” e já haviam sido analisados anteriormente por PCR - SSCP quanto à presença de mutações no gene *TP53*, nos exons 5-8, por Tatiana Perecmanis, em nosso laboratório; tendo sido encontrada apenas uma alteração no SSCP do exon 7 do T15, a qual não foi confirmada pelo seqüenciamento manual realizado pela mesma. Para a confirmação desse resultado, neste trabalho todos esses tumores anaplásicos, exceto o T1 (por não haver

mais tecido disponível para extração de DNA), foram seqüenciados por seqüenciamento automático, para os mesmos exons, não sendo encontrada mutação também por este método de seqüenciamento.

Dos tumores papilíferos da variante esclerosante difusa da série de casos estudados, 5 foram analisados quanto à presença de mutações no gene *TP53*, nos exons 5-8, por PCR - SSCP (T1A, T2A, T3A, T5A e T6A); não tendo sido encontrados padrões eletroforéticos alterados, o que indica não haver mutação nesses exons. Todos esses tumores eram provenientes de biópsias cirúrgicas arquivadas.

5 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53

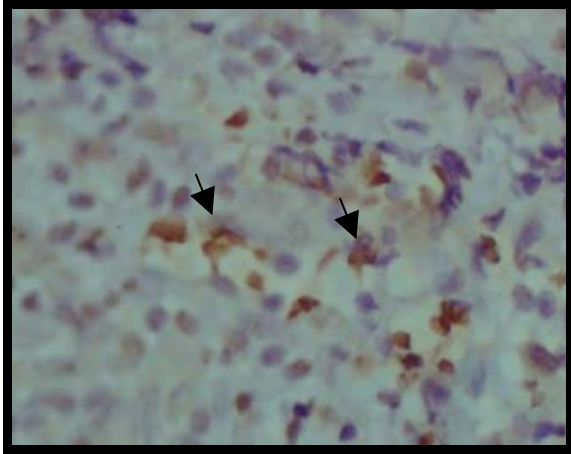
A análise da expressão da proteína p53 por imunohistoquímica foi estudada nessa série de casos nos tumores considerados mais agressivos em termos histológicos, ou seja, os mais indiferenciados – anaplásicos e papilíferos da variante esclerosante difusa. Esta etapa do trabalho foi realizada no Hospital Universitário Gaffrée e Güinle.

Os tumores anaplásicos T2, T15, T20 e T24 (o tumor T1 não foi analisado por não haver mais tecido disponível do mesmo) e os tumores papilíferos da variante esclerosante difusa T1A, T2A, T3A, T5A, T6A, T11A e T14A foram analisados para expressão de p53 por imunohistoquímica. A coloração castanha na região nuclear foi considerada positiva para a expressão da proteína p53 e o resultado foi categorizado de acordo com a quantidade relativa de núcleos corados observados, variando de negativo (-), fracamente positivo (+), positivo (++) a fortemente positivo (+++). A **TABELA 8** apresenta os resultados dessa análise.

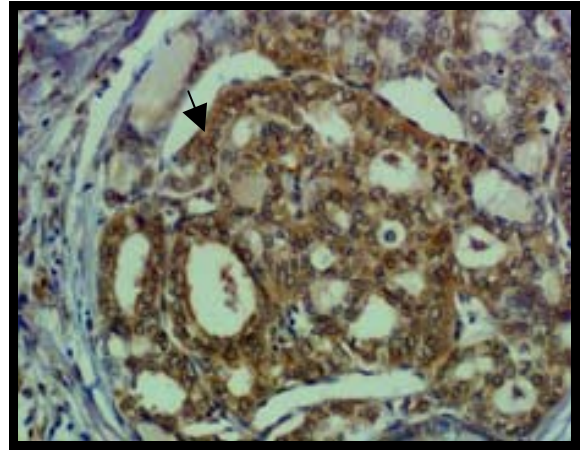
TABELA 8 – Resultados da análise da expressão da proteína p53 por imunohistoquímica. IHQ – Imunohistoquímica, ATC – carcinoma anaplásico da tireóide, PTCVED – variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero da tireóide, (-) negativo, (+) fracamente positivo, (++) positivo, (+++) fortemente positivo.

Caso	Diagnóstico	Expressão de p53 por IHQ
T2	ATC	+++
T15	ATC	+++
T20	ATC	+++
T24	ATC	+
T1A	PTCVED	+
T2A	PTCVED	++
T3A	PTCVED	+
T5A	PTCVED	+
T6A	PTCVED	+
T11A	PTCVED	+++
T14A	PTCVED	+++

Dentre os carcinomas indiferenciados ou anaplásicos da tireóide (ATC) observa-se uma alta expressão da proteína p53 em 75% dos casos (3/4), enquanto nos carcinomas papilíferos da variante esclerosante difusa apenas 28,6% (2/7) apresentam alta expressão de p53. A **FIGURA 15** mostra uma fotomicrografia da expressão de p53 por imunohistoquímica do tumor 14A.



A



B

FIGURA 15 – Fotomicrografias de tumores analisados neste trabalho, corados por imunohistoquímica para a proteína p53. A – Carcinoma anaplásico, aumento original 400x; B – PTC variante esclerosante difusa, aumento original 200x. As setas indicam alguns núcleos fortemente corados, indicando alta expressão da p53.

V - DISCUSSÃO

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina maligna mais freqüente e com maior taxa de mortalidade. Embora relativamente rara, essa doença maligna tem crescido em incidência no Brasil e em várias partes do mundo, e seu prognóstico, de um forma geral, tem sido melhor, provavelmente devido a um diagnóstico mais precoce. O único fator de risco bem estabelecido para o câncer de tireóide é a história de exposição prévia à radiação ionizante, e diferenças de taxas de incidência encontradas em diversas partes do mundo podem ser devidas a diferenças nos métodos de detecção e ao envolvimento de fatores ambientais (Coeli *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006).

Os carcinomas das células foliculares da tireóide representam mais de 95% desse tipo de câncer, e constituem um interessante modelo para o estudo de eventos moleculares envolvidos na carcinogênese em múltiplos passos, uma vez que desse tipo celular originam-se tumores com características histológicas, potencial maligno e grau de diferenciação distintos (Moretti *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2006). Dentre os carcinomas bem-diferenciados da tireóide, o carcinoma papilífero (PTC) é o tipo mais comum (85-90%) e cujo diagnóstico tem aumentado, possivelmente devido à mudança do critério diagnóstico de reconhecimento das características morfológicas nucleares, em vez da arquitetura papilífera somente (Kondo *et al.*, 2006). Embora os carcinomas papilíferos como um todo sejam neoplasias com comportamento biológico favorável e tenham em comum suas características morfológicas típicas, representam um grupo heterogêneo de tumores e vários estudos têm mostrado que alterações genéticas específicas podem influenciar na variante histológica observada e no comportamento tumoral (Adeniran *et al.*, 2006). Os carcinomas anaplásicos da tireóide podem ser originados da progressão de tumores bem-diferenciados pré-existentes, como o PTC, o que tem sido mostrado pela observação de sua coexistência com áreas de típica

morfologia papilífera e apresentação de alterações genéticas semelhantes (Quiros *et al.*, 2005).

Vários estudos têm mostrado a importância de mutações que levam à ativação constitutiva de proto-oncogenes componentes da via das MAP quinases (MAPK) nos estágios iniciais da patogênese do PTC, incluindo os rearranjos do gene *RET* (*RET/PTC*), mutações pontuais do gene *RAS* e mutações ou rearranjos do gene *BRAF*. Mutações inativadoras do gene supressor de tumor *TP53* estão associadas com a progressão de tumores bem-diferenciados (PTC, FTC) para indiferenciados, o que é evidenciado pela presença restrita dessas mutações em carcinomas de comportamento mais agressivo (Kondo *et al.*, 2006).

Neste trabalho foram avaliadas as freqüências de mutações do exon 15 do gene *BRAF* em carcinomas papilíferos e suas variantes, e em carcinomas anaplásicos. Também foi verificada a presença de mutações nos exons 5 a 8 do gene *TP53* e a expressão da proteína p53 por imunohistoquímica nos carcinomas com prognóstico mais agressivo, os anaplásicos e os papilíferos da variante esclerosante difusa. A presença dos rearranjos *RET/PTC*₁ e *RET/PTC*₃ também foi analisada nesses tumores a fim de se obter uma avaliação molecular mais completa dos casos estudados. É relevante observar que poucos estudos moleculares nos genes *BRAF* e *TP53* foram realizados até esse momento em carcinomas da variante esclerosante difusa do PTC, devido à sua raridade, e a importância de alterações nesses genes em sua etiologia molecular é bem pouco conhecida.

A série de casos estudada é constituída de pacientes de hospitais da cidade do Rio de Janeiro -RJ e da cidade de Campinas – SP que apresentaram diagnóstico histológico de PTC e suas variantes ou de ATC.

A revisão dos diagnósticos histológicos foi realizada em todos os casos em que havia material disponível para a confecção de lamina coradas com hematoxilina-eosina, a fim de

minimizar possíveis erros decorrentes da variação entre patologistas na classificação dos tipos histológicos e suas variantes.

Apesar dos casos analisados terem sido selecionados pelo tipo histológico, sem a utilização de critérios epidemiológicos, não podendo, portanto, representar a prevalência de casos na população, a série estudada apresentou distribuição semelhante ao descrito na literatura. Assim, foi observada uma predominância do tipo histológico papilífero (PTC), que englobando todas as variantes, correspondeu a 84,8% dos casos estudados.

Em relação à distribuição dos casos por gênero, tem-se uma predominância do sexo feminino em todos os tipos histológicos estudados, sendo relativamente alta neste trabalho, considerando o total dos casos (razão mulher: homem de 5,6), sendo que o relatado na literatura é de 3-4 mulheres para cada homem (Sakoda & Horn-Ross, 2002) (**FIGURA 13**).

A média de idade observada foi de $46,0 \pm 16,7$ (17-72) para o total dos casos estudados, sendo compatível com o descrito na literatura (20-50 anos) (Wojciechowska & Lewinski, 2006). Em relação aos tipos histológicos isoladamente, também foi observada essa correspondência. Nos casos de ATC a média encontrada foi $66,6 \pm 5,3$ (61-72), e a faixa de idade relatada é de 60 a 80 anos de idade (Kondo *et al.*, 2006; Cheah, 2007) e nos casos da variante esclerosante difusa do PTC foi de $35,6 \pm 21,9$ (17-71), tendo sido descrito que acomete principalmente mulheres jovens (Sheu *et al.*, 2007).

Dos 33 pacientes estudados foi possível obter dados sobre doença pregressa da tireóide em apenas 11 casos, sendo observada a ocorrência de bócio multinodular adenomatoso (BMNA) em 6 casos, todos de PTC, e 2 deles eram acompanhados de hipotireoidismo. Também foram observados 3 casos de hipertireoidismo, 1 PTC e 2 ATC, esses últimos também com Doença de Graves. A Tireoidite de Hashimoto ocorreu em 2 casos da variante esclerosante difusa do PTC, e em quase todos os casos dessa variante foi possível observar a presença de infiltrado linfocitário (**TABELA 6**).

Em relação aos casos de ATC, 2 dos 5 analisados (T15 e T24) apresentaram história anterior de Doença de Graves, o que representa 40% de prevalência para esse tipo histológico. A ocorrência de câncer de tireóide em associação com Doença de Graves tem sido relatada em diversos estudos, mas ainda é motivo de controvérsia entre vários autores, assim como o comportamento destes tumores. Alguns autores sugerem que os pacientes com Doença de Graves têm uma prevalência aumentada não só de nódulos benignos, mas também de carcinomas da tireóide, principalmente PTC, sugerindo que a Doença de Graves estimula a manifestação clínica do carcinoma oculto. Além disso, descrevem maior agressividade do que a habitual, como uma ocorrência maior de metástases distantes e de morte pela doença nesses pacientes (Pellegriti *et al.*, 1998; Belfiore *et al.*, 2001). Outros autores encontram, na maioria dos casos, microcarcinomas diferenciados sem expressão clínica (Peixoto *et al.*, 2003). A incidência do câncer de tireóide em pacientes com Doença de Graves varia de 0,1% a 21,5% conforme as séries estudadas, e a discrepância observada nos diversos estudos pode ser explicada por vários fatores, como o critério de seleção dos pacientes, diferenças na extensão da ressecção cirúrgica, história de irradiação na região de cabeça e pescoço, principalmente na infância e nível de ingestão de iodo (Peixoto *et al.*, 2003).

Os auto-anticorpos estimuladores do receptor de TSH (TRAb) parecem estar envolvidos na carcinogênese tireoideana associada à Doença de Graves de uma forma direta, promovendo um estímulo hiperplásico da célula tireoideana e envolvendo a via de sinalização do TSH (**FIGURA 5**), ou de maneira indireta, por aumento da expressão do receptor de insulina e de fatores de crescimento endoteliais (VEGF), estimulando a angiogênese e o crescimento celular (Belfiore *et al.*, 2001).

Embora não haja concordância absoluta quanto a uma maior incidência e agressividade do câncer de tireóide em pacientes com Doença de Graves, a maioria dos estudos indica uma associação positiva, sugerindo que a concomitância dessas condições

representa um fator de mau prognóstico para pacientes com carcinomas bem-diferenciados da tireóide (Belfiore *et al.*, 2001; Peixoto *et al.*, 2003).

A Tireoidite de Hashimoto foi observada em 2 casos da variante esclerosante difusa do PTC (1A e 2A), e a presença de infiltrado linfocitário foi observada em quase todos os casos, sendo considerado um achado comum no PTC, sobretudo nessa variante. O envolvimento de fatores imunológicos no risco para o câncer de tireóide tem sido considerado, embora ainda seja necessário estabelecer relações seguras de causa e efeito, determinando se atuam como agentes causadores da neoplasia ou se são consequência desta (Kondo *et al.*, 2006).

Cabe ressaltar que devido à falta de informações da maioria dos casos, não foi possível neste trabalho fazer uma avaliação destes pacientes em relação à história de doença da tireóide e evolução para o câncer.

O estadiamento dos tumores não foi avaliado, já que os hospitais dos quais os casos estudados foram obtidos não realizam rotineiramente tireoidectomia total como procedimento terapêutico. Sendo assim, não foi possível avaliar precisamente a extensão das lesões, acometimento da cápsula tireoideana e de linfonodos para vários casos. Uma outra razão para a dificuldade de análises das características histo-patológicas foi a ausência de dados nos prontuários desses pacientes, como pode ser observado na **TABELA 6**.

As alterações genéticas em tumores tireoideanos têm sido extensivamente estudadas e descritas. O estudo dessas alterações tem contribuído para a elucidação dos mecanismos patogénéticos, para a definição de prognósticos e identificação de indivíduos assintomáticos ou com lesões pré-clínicas com risco de desenvolver o câncer de tireóide, melhorando as chances de um diagnóstico mais preciso e precoce. Além disso, as análises moleculares têm cada vez mais sido reconhecidas como ferramentas auxiliares na classificação correta dessas lesões, em relação aos subtipos histológicos e suas variantes.

A maioria das alterações genéticas encontradas no câncer de tireóide envolve genes que exercem sua atividade oncogênica principalmente através da ativação da via MAP quinase (RET/PTC→RAS→RAF→MEK→ERK). A ativação dessa via é um mecanismo freqüente e importante na iniciação e progressão dos cânceres humanos através da estimulação da divisão e da proliferação celular e quando constitutivamente ativada a via MAP quinase promove a tumorigênese. Nos carcinomas papilíferos da tireóide, alterações genéticas somáticas, como mutações nos genes *BRAF* ou *RAS* e rearranjos gênicos nos genes *RET*, *NTRK1* e *BRAF* são detectáveis em aproximadamente 70% dos casos quando somadas (Melillo *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2006). A proteína BRAF é uma serina/treonina quinase efetora da via MAP quinase, ativada pela proteína RAS ligada ao GTP, que, por sua vez, quando fosforilada (forma ativa) ativa a proteína MEK por fosforilação, dando prosseguimento à transdução do sinal da via (**FIGURA 5** – capítulo da Introdução). Mutações somáticas no gene *BRAF* foram relatadas primeiramente em melanomas malignos por Davies e colaboradores e também no câncer de ovário e colorretal (Davies *et al.*, 2002). A transversão T1799A no exon 15 do gene *BRAF*, que promove a troca do aminoácido valina para ácido glutâmico na proteína BRAF (BRAF^{V600E}), é a mais comum mutação desse gene no PTC, representando 90% das alterações encontradas. Tal mutação torna a proteína BRAF constitutivamente ativada, promovendo um ganho de função independente de sinais ativadores, levando à ativação constitutiva da via MAP quinase, o que pode resultar no desenvolvimento de neoplasia maligna da tireóide.

As mutações do gene *BRAF* são encontradas em 29-69% dos casos de PTC, sendo a alteração genética mais freqüente nesse tipo histológico. Na agressiva variante de células altas do PTC observa-se uma prevalência ainda maior dessas mutações (55–100%), enquanto na variante folicular tem sido relatada uma prevalência relativamente baixa (7–14%) (Kondo *et al.*, 2006). Na série de casos estudada observou-se entre os carcinomas papilíferos clássicos

uma prevalência de 38,9% da mutação T1799A, o que está de acordo com o relatado na literatura, enquanto na variante folicular não foi observada essa mutação (**TABELA 7**).

As mutações do gene *BRAF* ocorrem também nos carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados derivados do PTC (Wojciechowska & Lewinski, 2006). Em carcinomas anaplásicos coexistindo com regiões de PTC observa-se uma prevalência dessas mutações significativamente mais alta (60–78%) do que em carcinomas anaplásicos sem regiões de PTC (0–4%) (Kondo *et al.*, 2006). Entre os casos estudados neste trabalho não foi observada a mutação T1799A em nenhum dos casos de ATC.

Por sua raridade, poucos estudos apresentam dados sobre a prevalência de mutações do gene *BRAF* em casos da variante esclerosante difusa do PTC, sendo relatado um estudo de 2 casos sem a mutação T1799A (Xing, 2005) e um estudo com 7 casos, também sem a presença dessa mutação (Sheu, 2007). Interessantemente dois casos da série estudada neste trabalho apresentaram a mutação, representando uma prevalência de 28,6% nessa variante.

Outras mutações do exon 15 do gene *BRAF* também já foram descritas no câncer de tireóide, como a mutação $BRAF^{K601E}$ e a deleção $BRAF^{VK600-1E}$, ocorrendo, respectivamente, na variante folicular e na variante sólida do PTC. A mutação $BRAF^{VK600-1E}$ também já foi descrita em metastases de PTC (Trovisco *et al.*, 2006). Essa especificidade em relação à ocorrência nessas variantes histológicas pode indicar uma possível correlação genótipo-fenótipo (Kondo *et al.*, 2006). Como descrito anteriormente, as amostras com padrão alterado no SSCP para o fragmento correspondente ao exon 15 do gene *BRAF* foram seqüenciadas, tendo sido, portanto, também avaliada a presença dessas mutações nos casos estudados. No entanto, nenhuma dessas mutações foi observada nos tumores submetidos ao seqüenciamento.

Alguns estudos que avaliaram uma possível correlação entre a mutação $BRAF^{V600E}$ e a presença de características clínico-patológicas mais agressivas, tais como metastases distantes e regionais, estágios clínicos mais avançados do tumor, extensão extratireoideana,

recorrência, idade mais avançada e gênero masculino, têm apresentado resultados que indicam a existência dessa associação (Adeniran *et al.*, 2006; Salvatore *et al.*, 2006; Trovisco *et al.*, 2006). Um dos estudos realizados foi uma meta-análise multifatorial que usou uma grande série de casos, mostrando significância estatística entre a mutação BRAF^{V600E} e características de maior agressividade, incluindo extensão extratireoideana, metástase regional, estágio tumoral mais avançado e recorrência. Esse estudo também encontrou uma associação significativa entre essas mutações e um menor tamanho de tumor, indicando que a mutação deve ocorrer nos estágios iniciais, mas esse dado parece ser controverso ao se considerar as outras características relacionadas ao comportamento mais agressivo (Xing, 2005).

A associação entre a presença de mutações no *BRAF* e maior índice de mortalidade não foi encontrada em nenhum estudo, por causa da raridade relativa e crescimento indolente dos tumores da tireóide, o que torna difícil a realização desse tipo de análise (Trovisco *et al.*, 2006).

Na série de casos estudada, não pôde ser realizada uma análise estatística em relação à associação entre a presença da mutação no *BRAF* e características clínico-patológicas, devido ao pequeno número de casos e a ausência de dados de muitos dos pacientes.

É importante ressaltar que em vários estudos as séries de PTC são analisadas quanto à presença de mutações no gene *BRAF* sem levar em consideração sua composição em relação aos subtipos do PTC. Esse fato pode explicar parcialmente a grande variação observada na prevalência de mutações, uma vez que as mutações no *BRAF* apresentam certa especificidade em relação ao tipo histológico. Além disso, existe o fato de que diferentes observadores comumente classificam os subtipos histológicos diferentemente, trazendo imprecisões na relação genótipo-fenótipo observada (Xing, 2005). Ainda, os diferentes métodos de análise de mutação utilizados podem trazer discrepâncias nos resultados descritos.

Em relação ao método de detecção empregado na análise da presença da mutação T1799A neste trabalho (PCR-SSCP e posterior seqüenciamento das amostras com padrão eletroforético alterado), outro trabalho mostrou que essa técnica apresentou a mesma taxa de detecção que a técnica de “*real-time* PCR”, considerada bastante sensível (Wojciechowska & Lewinski, 2006).

Os rearranjos *RET/PTC* também são alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento dos carcinomas papilíferos, sendo o tipo de alteração genética mais freqüente nesses tumores, após as mutações no gene *BRAF*. A prevalência desses rearranjos no PTC varia de 3-85%, dependendo dos métodos de detecção utilizados e localização geográfica, ficando na maioria dos estudos entre 13-43% (Kondo *et al.*, 2006). A análise da freqüência dos dois rearranjos mais comuns em carcinomas papilíferos esporádicos, *RET/PTC₁* e *RET/PTC₃*, foi realizada anteriormente nos tumores desse trabalho, por RT-PCR (artigo em anexo – Anexo 1). Foi possível detectar a presença do rearranjo *RET/PTC₁* em 18,2% dos tumores analisados, do *RET/PTC₃* em 31,8% e de ambos os rearranjos ocorrendo simultaneamente em 9,1%. Somando-se a ocorrência dos dois rearranjos verifica-se que estão presentes em 41% dos tumores analisados (**TABELA 7**), dentro do relatado na literatura. A ocorrência de rearranjos *RET/PTC* em pacientes com carcinoma papilífero tem sido associada com uma faixa etária mais jovem, arquitetura papilífera clássica e maior prevalência de metástases em linfonodos regionais, embora a grande maioria dos pacientes apresentem tumores de pequeno tamanho, sugerindo a presença desses rearranjos logo nos estágios iniciais da doença (Adeniran *et al.*, 2006). A correlação entre a presença desses rearranjos e o prognóstico clínico ainda é obscura, por vezes sendo considerados associados a características de mau prognóstico, como metástases distantes, por vezes sendo associado apenas com os estágios iniciais do PTC, não parecendo estar envolvidos com a progressão tumoral. Uma

possível explicação para essas discrepâncias é a diferença do potencial oncogênico que tem sido investigada entre os diversos tipos de rearranjo (Basolo *et al.*, 2002).

Em dois casos desse estudo foi observada a expressão de ambos os rearranjos, *RET/PTC₁* e *RET/PTC₃* (**TABELA 7**). Um desses casos, o paciente identificado com T40, é homem, com 47 anos ao diagnóstico, tumor maior que 5,0 cm e apresentou PTC com características agressivas, com metástase para linfonodos e invasão vascular. O outro caso é o paciente identificado como T55, mulher com 25 anos ao diagnóstico e PTC com metástase para linfonodos e infiltração do tecido adiposo (**TABELA 6**). Observa-se que ambos os casos apresentam PTC de comportamento mais agressivo, com extensão extratireoideana, metástase em linfonodos e no caso do T40 um tumor com tamanho aumentado. A presença de mais de um tipo de rearranjo do gene *RET* em um único tumor tem sido relacionada com a ocorrência de eventos mais tardios no processo de tumorigênese, ou ainda pode significar uma multifocalidade na transformação da lesão neoplásica benigna para maligna (Kondo *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm mostrado uma ausência de ocorrência concomitante de rearranjos no gene *RET* e mutações no gene *BRAF* (Kondo *et al.*, 2006; Xing, 2005; Salvatore *et al.*, 2004), exceto por um estudo realizado por Xu e colaboradores (Xu *et al.*, 2003), mostrando uma sobreposição entre essas duas alterações em 8 de 21 tumores que apresentaram mutações no gene *BRAF*. Esse estudo, no entanto, descreve a avaliação da expressão de rearranjos *RET/PTC* através de imunohistoquímica, usando anticorpos para a porção C-terminal do gene *RET*, que não fazem distinção entre a proteína RET selvagem e rearranjos. Interessantemente, em dois casos desse trabalho foi possível observar a presença simultânea de rearranjos *RET/PTC* e da mutação *BRAF*^{V600E}. Ambos os casos são de mulheres apresentando PTC clássico (**TABELA 7**). O caso T5 apresentou 37 anos ao diagnóstico e há relato de invasão e aderência à traquéia, mostrando ter comportamento

agressivo. O caso T91 apresentou ao diagnóstico 45 anos, mas não foi possível obter quaisquer dados clínicos sobre essa paciente (**TABELA 6**). Provavelmente a via MAP quinase está intensamente ativada pela ocorrência simultânea de dois eventos oncogênicos, o que deve estar promovendo um potencial mais agressivo a esses dois tumores papilíferos clássicos, que usualmente possuem um comportamento indolente.

Diferentemente do que se observa para os cânceres humanos de uma forma geral, as mutações no gene *TP53* não são frequentes no câncer da tireóide, ocorrendo em apenas 10% desses tumores (Malaguarnera *et al.*, 2007). A presença dessas mutações inativadoras tem sido restrita a tumores com comportamento mais agressivo, ocorrendo entre 17 e 38% dos carcinomas pouco diferenciados e entre 67 e 88% dos tumores anaplásicos, enquanto nos tumores bem-diferenciados ocorre em apenas 0 a 9% dos casos. Acredita-se, com base nessas evidências, que essas mutações sejam responsáveis principalmente pela progressão de tumores bem-diferenciados para fenótipos mais agressivos e pouco diferenciados. A inativação da proteína p53 induz à instabilidade genômica, com um sistema de reparo do DNA ineficiente, o que favorece grandemente a progressão tumoral (Kondo *et al.*, 2006; Malaguarnera *et al.*, 2007).

A maioria das mutações do gene *TP53* ocorre nos exons 5-8, que correspondem ao domínio de ligação da proteína ao DNA. Esses exons foram analisados no presente trabalho quanto à ocorrência de mutações nos carcinomas mais indiferenciados, ou seja, nos carcinomas anaplásicos e nos casos da variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero (PTCVED), não tendo sido encontrada mutação alguma.

Esse resultado é discordante da maioria dos estudos realizados, que têm demonstrado uma baixa frequência de mutações em *TP53* nos carcinomas bem-diferenciados e uma alta frequência dessas mutações nos carcinomas anaplásicos (Fagin *et al.*, 1993; Donghi *et al.*, 1993). Entretanto, já foi descrita a presença de mutações no *TP53* em carcinomas da tireóide

em vários estágios clínicos, não encontrando associação entre a presença de mutações e o tipo histológico ou estágio do tumor (Zou *et al.*, 1993), assim como a ausência de mutações em um trabalho com 4 tumores anaplásicos (Ho *et al.*, 1996). Essa diferença de resultados pode ser devida aos diferentes métodos de detecção empregados e sugere que a inativação da proteína p53 no câncer da tireóide ainda é objeto de investigação mais acurada.

Estudos em grandes séries de tumores da tireóide sugerem que embora a p53 não esteja mutada, sua atividade possa estar inibida por outros mecanismos. De fato observa-se uma expressão aumentada de p53 não só no ATC e carcinomas pouco diferenciados, onde as mutações são frequentes, mas também em tumores bem diferenciados, mesmo sem mutação (Malaguarnera *et al.*, 2007). Neste trabalho também foi avaliada a expressão da proteína p53 por imunohistoquímica, nos tumores anaplásicos e na variante esclerosante difusa do PTC (PTCVED), sendo encontrada uma alta expressão da proteína p53 em 75% dos casos de ATC e em 28,6% dos casos da PTCVED. Uma expressão aumentada da p53 tem sido relatada em mais de 50% dos casos de ATC (Almudevar *et al.*, 2000), mas pode ocorrer também em carcinomas bem-diferenciados da tireóide, como no PTC, onde já foi descrita em 27% dos casos (Horie *et al.*, 2001). O resultado encontrado neste estudo da expressão da p53 para o ATC está de acordo com o relatado na literatura, e para a PTCVED se aproxima ao valor relatado para o PTC.

Embora o acúmulo da proteína p53 tenha sido tradicionalmente atribuído à estabilização da p53 mutada, tem sido mostrado que a p53 selvagem também pode se mostrar estável (Horie *et al.*, 2001). Vários mecanismos independentes podem constituir hipóteses para explicar a inativação da p53 selvagem nos carcinomas da tireóide, incluindo a retenção citoplasmática da p53 e a superexpressão da proteína reguladora MDM2, que ocorrem mesmo em tumores bem-diferenciados da tireóide, havendo uma correlação direta entre seu nível de expressão e um pior prognóstico. Esses achados indicam que a p53 não está envolvida apenas

na progressão tumoral, podendo ter importância nos estágios mais iniciais, uma vez que a atividade da p53 selvagem pode ser inibida por vários mecanismos inativadores agindo sobre a proteína e/ou sua via de sinalização. Outros mecanismos envolvidos são baseados na expressão de proteínas com função dominante negativa da complexa rede de isoformas dos membros da família p53 (Malaguarnera *et al.*, 2007).

Esses relatos indicam a complexidade do assunto e a necessidade de estudos para a elucidação do papel da p53 e evolução do câncer de tireóide.

No presente trabalho foram avaliados aspectos moleculares de 33 casos de carcinomas da tireóide. Um enfoque maior foi dado à análise das principais alterações descritas, quais sejam: a mutação T1799A no gene *BRAF*, rearranjos *RET/PTC* e mutações em *TP53*. Enormes dificuldades foram encontradas na obtenção dos dados clínicos dos pacientes, o que não permitiu um estudo mais aprofundado do papel dessas alterações moleculares na avaliação da doença. No entanto, este estudo indica a importância da análise molecular no auxílio da identificação dos subtipos histológicos e evolução do câncer de tireóide.

VI - CONCLUSÕES

- A frequência da mutação T1799A do exon 15 do gene *BRAF* nos carcinomas papilíferos, incluindo suas variantes, foi de 32,1%, indicando a participação do proto-oncogene *BRAF* na etiologia do PTC.
- Entre as variantes dos carcinomas papilíferos, a frequência da mutação T1799A do exon 15 do gene *BRAF* foi: 38,9% nos papilíferos clássicos, 28,6% na variante esclerosante difusa e 0% na variante folicular.
- Nos carcinomas anaplásicos não foi encontrada a mutação T1799A do exon 15 do gene *BRAF*.
- A presença simultânea da mutação T1799A do exon 15 do gene *BRAF* e de rearranjos *RET/PTC* foi observada em dois carcinomas analisados. Tal ativação oncogênica ocorrendo em dois efetores da via MAP quinase parece conferir a esses tumores um maior potencial maligno.
- Não foram encontradas mutações nos exons 5-8 do gene *TP53* entre os carcinomas anaplásicos e papilíferos da variante esclerosante difusa analisados, porém a proteína p53 apresentou uma expressão aumentada em 75% dos carcinomas anaplásicos e em 28,6% dos carcinomas papilíferos da variante esclerosante difusa. Esse acúmulo da proteína p53 possivelmente é devido a outros mecanismos de inativação diferentes de mutação.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, *et al.* Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(2):216-22.

Almudévar E, Puras A, De Miguel C, *et al.* Aplicación de las oncoproteínas p21RAS, p53, Bcl-2 y del factor de proliferación celular Ki-67(MIB-1) en el diagnóstico y pronóstico de tumores. *An Sist Sanit Navar* 2000; 23(2):247-255.

Baloch ZW, LiVolsi VA. Our approach to follicular-patterned lesions of the thyroid. *J Clin Pathol* 2007; 60(3):244-250.

Basílio-de-Oliveira, CA. Da variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero da tireóide.1990. 94f. Tese (Livre docência em Anatomia Patológica) – Escola de Medicina e Cirurgia da Universidade do Rio de Janeiro (UNI-RIO), Rio de Janeiro.

Basolo F, Giannini R, Monaco C, *et al.* Potent Mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene Correlates with its Prevalence in Tall – Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160(1):247-54.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive staining of DNA in polyacrilamde gels. *Anal Biochem.* 1991; 196(1): 80 - 83.

Belfiore A, La Rosa GL, La Porta GA, *et al.* Cancer Risk in Patients With Cold Thyroid Nodules: Relevance of Iodine Intake, Sex, Age, and Multinodularity. *The Am J Med* 1992; 93(4):363-369.

Belfiore A, Russo D, Vigneri R, *et al.* Grave's disease, thyroid nodules and thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2001; 55(6): 711-718.

Bleyer A, Viny A, Ronald B. Cancer in 15- to 29-Year-Olds by Primary Site. *Oncologist* 2006; 11:590-601.

Borges A. Incidentaloma Focal da tireóide - Avaliação Médica Baseada na Evidência. *Acta Med Port* 2006;19: 325 - 334.

Bucci A, ShoreFreedman E, Gierlowski T, *et al.* Behavior of Small Thyroid Cancers Found by Screening Radiation - Exposed Individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8):3711-3716.

Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, *et al.* Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(10):724-732.

Chiloeches A, Marais R. Is BRAF the Achilles' heel of Thyroid Cancer? *Clin Cancer Res* 2006; 12(6):1661-1664.

Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, *et al* Incidência e Mortalidade por Câncer de Tireóide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49: 503-509.

Collini P, Mattavelli F, Barisella M, *et al.* Papillary carcinoma of the thyroid gland of childhood and adolescence: Morfologic subtypes, biologic behavior and prognosis: a clinicopathologic study of 42 sporadic cases treated a single institution during a 30-year period. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(11):1420-1426.

Cornett WR, Sharma AK Day TA, *et al.* Anaplastic thyroid carcinoma: an overview. *Curr Oncol Rep* 2007; 9(2):152-158.

Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-954.

Donghi R, Longoni, A, Pilotti, S, *et al.* Gene p53 Mutations Are Restricted to Poorly Differentiated and Undifferentiated Carcinomas of the Thyroid Gland. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:1753-1760.

Egawa C, Miyoshi Y, Iwao K, *et al.* Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α and $-\beta$ Messenger RNA Expression in Normal and Malignant Thyroid Tissues by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Oncology* 2001; 61(4):293-298.

Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, *et al.*, High Prevalence of Mutations of the p53 Gene in Poorly Differentiated Human Thyroid Carcinomas. *J Clin Invest* 1993; 91:179-184.

Fagin JA. Minireview: Branded from the Start—Distinct Oncogenic Initiating Events May Determine Tumor Fate in the Thyroid. *Mol Endocrinol* 2002; 16(5):903-911.

Fagin JA. a Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics--role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(9):4264-4266.

Fagin JA. b How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol* 2004; 183(2):249-256.

Fagin JA. Genetics of papillary thyroid cancer initiation: Implications for therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2005; 116:259-69.

Fincham S, Ugnat AM, Hill G, *et al.* Is occupation a risk factor for thyroid cancer? Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *J Occup Environ Med* 2000; 42(3):318-322.

Frasca F, Vella V, Aloisi A *et al.* p73 Tumor-Suppressor Activity Is Impaired in Human Thyroid Cancer. *Cancer Res* 2003; 63(18):5829-5837.

Fusco A, Viglietto G, Santoro M. A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. *J Clin Invest* 2005; 115(1):20-23.

Gheriani H. Update on epidemiology classification, and management of thyroid cancer. *Libyan J Med* 2006; 1(1):83-95.

Gimm O. Thyroid cancer. *Cancer Lett* 2001; 163:143-156.

Graf H. Poorly differentiated thyroid carcinomas: new therapeutic considerations. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(6):991-995.

Granja F, Morari J, Morari EC, *et al.* Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 2004; 210(2):151-157.

Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 2002; 84: 83–93.

Haselkorn T, Stewart SL, Horn-Ross PL. Why Are Thyroid Cancer Rates So High in Southeast Asian Women Living in the United States? The Bay Area Thyroid Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(2):144-150.

Hemminki K, Eng C, Chen B. Familial Risks for Nonmedullary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(10):5747-5753.

Horie S, Maeta H, Endo K, *et al.* Overexpression of p53 protein and MDM2 in papillary carcinomas of the thyroid: Correlations with clinicopathologic features. *Pathol In.* 2001; 51(1): 11-15.

Horn-Ross PL, Morris JS, Lee M, *et al.* Iodine and Thyroid Cancer Risk among Women in a Multiethnic Population: The Bay Area Thyroid Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 979-985.

Horn-Ross PL, Hoggatt KJ, Lee MM. Phytoestrogens and Thyroid Cancer Risk: The San Francisco Bay Area Thyroid Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:43-49.

Ho YS, Tseng SC, Chin, TY, *et al.* p53 gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 1996; 103(1): 57-63.

Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, *et al.* Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(26):15044-15049.

Hunt JL, Tometsko M, LiVolsi VA, *et al.* Molecular Evidence of Anaplastic Transformation in Coexisting Well-Differentiated and Anaplastic Carcinomas of the Thyroid. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(12): 1559 - 1564.

INCA / MS - Câncer da Tireóide. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

Kanaseki T, Harabuchi Y, Wakashima J, *et al.* A case of anaplastic thyroid carcinoma surviving disease free for over 2 years. *Auris Nasus Larynx* 1999; 26: 217–220.

Keat CW. Thyroid cancer: diagnosis and management. *Singapore Med J* 2007; 48(2): 107-113.

Kodama Y, Asai N, Kawai K, *et al.* The RET proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer. *Cancer Sci.* 2005; 96(3):143-148.

Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosh P. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med.* 2002; 2002:1-18.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 292 - 306.

Latonen L, Laiho M. Cellular UV damage responses—Functions of tumor suppressor p53. *Biochim et Biophys Acta* 2005; 1755: 71 – 89.

Learoyd DL, Messina M, Zedenius J, Robinson BG. Molecular Genetics of Thyroid Tumors and Surgical Decision-making. *World J Surg* 2000; 24: 923-933.

Le HN, Norton JA. Perspective on RET Proto-Oncogene and Thyroid Cancer. *Cancer J* 2000; 6(2): 50 - 57.

Liska J, Altanerovav V, Galbavy S, *et al* Thyroid tumors: Histological Classification and genetic factors involved in the development of thyroid cancer. *Endocr regul* 2005; 39(3):73-83.

LiVolsi VA, Baloch ZW. Follicular Neoplasms of the Thyroid View, Biases, and Experiences. *Adv Anat Pathol* 2004; 11(6): 279-287.

Maciel RM, Kimura ET, Cerutti JM. Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005; 49(5):691-700.

Mack WJ, Preston-Martin, Bernstein L, Qian D. Lifestyle and Other Risk Factors for Thyroid Cancer in Los Angeles County Females. *Ann Epidemiol* 2002; 12(6): 395 – 401.

Mai KT, Thomas J, Yazdi HM, *et al*. Pathologic study and clinical significance of Hurtle cell papillary thyroid carcinoma. *App Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12(4):329-337.

Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, *et al*. p53 family proteins in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 43–60.

Manié S, Santoro M, Fusco A, Billaud M. The RET receptor: Function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* 2001; 17(10):580-589.

Maxwell EL, Palme CE, Freeman J. Hürthle Cell Tumors: Applying Molecular Markers to Define a New Management Algorithm. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*.2006; 132(1):54-58.

McKinney K, Prives C. Regulation of p53 binding. In: Hainaut P, Wiman KG. *25 Years of p53 Research*. Dordrecht: Springer, 2005. p.27-51.

Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, *et al*. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 2005; 115(4):1068-1081.

Michels JJ, Jacques M, Henry-Amar M, *et al*. Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2007; 38(2):212-219.

Moretti F, Nanni S, Pontecorvi A. Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; 14(4):517-539.

Morgunkova A A. The p53 Gene Family: Control of Cell Proliferation and developmental Programs. *Biochemistry* 2005; 7(9): 955-971.

Muro-Cacho CA, Ku NN. Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features-part1. *Cancer Control* 2000; 7(3):276-287.

Negri E, Ron E, Franceschi S, *et al*. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. I. Methods. *Cancer Causes Control* 1999; 10(2):131-142.

Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, *et al*. Solid Variant of Papillary Thyroid Carcinoma Incidence, Clinical–Pathologic Characteristics, Molecular Analysis, and Biologic Behavior. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(12): 1478-1484.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5(4): 874 - 879.

Pasieka JL. Anaplastic thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* 2003; 15(1):78-83.

Peixoto MA, Taboada GF, Wagman MB, *et al.* Avaliação da Incidência e do Comportamento do Câncer de Tireóide em Pacientes Com Doença de Graves Submetidos a Tireoidectomia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47(5):566-571.

Pellegriti G, Belfiore A, Giuffrida D, *et al.* Outcome of differentiated cancer in Grave's patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(8): 2805-2809.

Pollock PM, Meltzer PS. Lucky draw in the gene raffle. *Nature* 2002; 417(6892):906-907.

Prendiville S, Burman KD, Ringel MD, *et al.* Tall cell variant: an aggressive form of papillary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000; 122(3):352-357.

Punales MK, Rocha AP, Gross JL, *et al.* Carcinoma medular de tireóide: aspectos moleculares, clínico-oncológicos e terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004; 48(1):137-146.

Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, *et al.* BRAF^{V599E} Mutation Is the Leading Genetic Event in Adult Sporadic Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5): 2414-2420.

Quiros RM, Ding HG, Gattuso, *et al.* Evidence that One Subset of Anaplastic Thyroid Carcinomas Are Derived from Papillary Carcinomas due to BRAF and p53 Mutations. *Cancer* 2005; 103(11):2261-2268.

Sakoda LC, Horn-Ross PL. Reproductive and Menstrual History and Papillary Thyroid Cancer Risk: The San Francisco Bay Area Thyroid Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:51-57.

Salabè GB. Pathogenesis of thyroid nodules: histological classification? *Biomed Pharmacother* 2001; 55(1):39-53.

Salvatore G, Giannini R, Faviana P, *et al.* Analysis of BRAF Point Mutation and RET/PTC Rearrangement Refines the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10):5175-5180.

Salvatore G, De Falco V, Salerno P, *et al.* BRAF Is a Therapeutic Target in Aggressive Thyroid Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(5):1623-1629.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Fusco A. Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(23):2954-2964.

Schmutzler C, Koehrlé J. Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol.* 2000; 143(1):15-24.

Sheu SY, Schwertheim S, Worm K, *et al.* Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: lack of *BRAF* mutation but occurrence of *RET/PTC* rearrangements. *Mod Pathol* 2007; 20(7):779-787.

Silva RLA. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor. In: Ferreira CG, Rocha, JCC. *Oncologia Molecular*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004; p.29-42.

Silvera SAN, Miller AB, Rohan TE. Risk factors for thyroid cancer: a prospective cohort study. *Int J Cancer* 2005; 116(3):433-438

Smailyte G, Miseikyte-Kaubriene E, Juozas K. Increasing thyroid cancer incidence in Lithuania in 1978 – 2003. *BMC Cancer* 2006; 6:284.

Sriram U, Patacsil LM. Thyroid Nodule. *Dis Mon* 2004; 50(9):486-526.

Suarez HG. Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis. *C R Acad Sci III* 2000; 323(6):519-28.

Trimboli P, Ulisse S, Graziano FM, *et al.* Trend in thyroid carcinoma size, age at diagnosis, and histology in a retrospective study of 500 cases diagnosed over 20 years. *Thyroid* 2006; 16(11):1151-1155.

Tronko MD, Howe GR, Bogdanova TI, *et al.* A Cohort Study of Thyroid Cancer and Other Thyroid Diseases After the Chernobyl Accident: Thyroid Cancer in Ukraine Detected During First Screening. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(13):897-903.

Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simões M. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Hum pathol* 2006; 37(7):781-786.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12(2):245-262.

Xing M, Tufano RP, Tufaro A P, *et al.* Detection of BRAF Mutation on Fine Needle Aspiration Biopsy Specimens: A New Diagnostic Tool for Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2867-2872.

Xu X, Quiros RM, Gattuso P, *et al.* High Prevalence of BRAF Gene Mutation in Papillary Thyroid Carcinomas and Thyroid Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 2003; 63: 4561–4567.

Wahl GM, Stommel JM, Krummel K, *et al.* Gatekeepers of the guardian: p53 regulation by post-translational modification, MDM2 and MDMX. In: Hainaut P, Wiman KG. *25 Years of p53 Research*. Dordrecht: Springer, 2005; p.73-113.

Ward LS. Epidemiologia do Câncer da Tireóide no Brasil: Apontando Direções na Política de Saúde do País. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(4):474-476.

Cancer Research UK - Age standardised (World) incidence rates, thyroid cancer, by sex and region of world, 2002 estimates. Disponível em: <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/thyroid/incidence/#sex>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

Weber F, Shen L, Aldred MA, *et al.* Genetic Classification of Benign and Malignant Thyroid Follicular Neoplasia Based on a Three-Gene Combination. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5):2512-2521.

Williams D. Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7): 543-549.

Wojciechowska K, Lewinski A. BRAF Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocr Regul.* 2006; 40:129-138.

Zabel EW, Alexander BH, Mongin SJ, *et al.* Thyroid cancer and employment as a radiologic technologist. *Int. J. Cancer* 2006; 119:1940-1945.

Zou M, Shi Y, Farid NR. p53 Mutations in All Stages of Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(4):1054-1058.

ANEXO 1

Artigo em Preparação

RET proto-oncogene activation in Brazilian thyroid carcinomas.

Valeria Regina Ayres de Moura¹, Tatiana Perecmanis², Silvia Loiola¹, Paola Sinibaldi³, Carlos Alberto Basílio⁴, Jodelia Henriques², Gabriella Marfè³, Paulo Mario Fernandes de Oliveira², Claudia Vitoria de Moura Gallo^{1*}

¹ Department of Celular Biology and Genetics – Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes – University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro , Brazil

² Department of Endocrinology – Faculty of Medical Sciences - University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro , Brazil

³ Department of Experimental Medicine and Biochemical Science – University of Roma “Tor Vergata” Roma, Italy

⁴ Departament of Pathology, Hospital Gaffrée-Günle, University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Key words: *RET*; gene rearrangement; proto-oncogene activation; thyroid cancer.

Running title: RET proto-oncogene in Brazilian thyroid carcinomas.

Correspondence to: Claudia Vitoria de Moura Gallo - Department of Cellular Biology and Genetics, Rua São Francisco Xavier, 524/2o andar – Maracanã – Rio de Janeiro – CEP. 20.550-013, Brazil, Tel. 55-21-2587-7567; fax: 55-21-2587-7377. E-mail: cgallo@uerj.br

Thyroid neoplasias comprise a broad spectrum of tumors with different biological characteristics and, when originated from the follicular thyroid cell, they can be of three different types: papillary, follicular and anaplastic. The papillary thyroid carcinoma is the most frequent and its evolution may be associated to rearranged forms of the gene *RET*, called *RET/PTC*, which have been considered hallmarks of this type of cancer. They result from the fusion of the *RET* tyrosine-kinase (TK) domain with the 5-terminal region of heterologous genes, leading to the formation of chimeric proteins. *RET/PTC1* and *RET/PTC3* are by far the two most common and it has been suggested by several authors as papillary carcinoma markers. In the present work we aimed to detect the activation of *RET* in Brazilian thyroid tumors using RT-PCR touchdown-nested strategy, and also, *RET* activation by means of the TK-Domain expression, using RT-PCR with specific primers directed to this gene region. Thirty thyroid tumors were analyzed: 14 papillary carcinomas, 3 follicular carcinomas and 13 benign thyroid tumors. The results showed that, although the most part of the papillary carcinomas presented TK-Domain activity, this analysis is not helpful for diagnosis of thyroid tumors since we detected this activity in benign ones. In the other hand, *RET/PTC 1* and *3* expression seems to be good markers of malignancy in Brazilian thyroid tumors.

Introduction

Thyroid neoplasias comprise a broad spectrum of tumours with different biological characteristics. They range from the benign adenoma to the highly aggressive anaplastic carcinoma. In Brazil, thyroid cancer incidence, adjusted by age, was estimated to be 0.7/100,000 to 3.0/100,000 males and 0.8/100,000 to 10.9/100,000 females (Coeli et al 2005). These tumours are very interesting models of study in molecular pathology because the follicular thyroid cell may originate the three different types of malign tumors: papillary, follicular and anaplastic. Although the MAP kinase pathway seems to be the most important in the pathogenesis of the disease (Fagin 2005), the three different types of thyroid cancer apparently come up from different sets of genes which were altered during tumor evolution. The most common type of thyroid cancer, papillary thyroid carcinoma, typically presents rearranged forms of *RET* and point mutations in *BRAF*. Point mutations in *RAS* are frequently observed in tumors of follicular type, and, a high prevalence of *TP53* mutations has been found in anaplastic thyroid carcinomas at the side of the other gene alterations as *BRAF* mutations (Gimm 2001; Nikiforov 2004). First described by Fusco et al 1987, several studies, including studies with transgenic mice (Santoro et al 1996) support that *RET* rearrangements are important events for the genesis of papillary carcinoma (Viglietto et al 1995; Jhiang 2000). The *RET* gene encodes a transmembrane receptor presenting an extracellular, a transmembrane and a tyrosine kinase domain. Altered forms of *RET*, called *RET/PTCs*, have been considered hallmarks of papillary thyroid cancer and result from the fusion of the *RET* tyrosine-kinase (TK) domain with the 5-terminal region of heterologous genes, leading to the formation of chimeric proteins. To date, at least 15 of such chimeric mRNAs involving 10 different genes have been reported. *RET/PTC1* (resulting from the fusion of *RET* with the *H4* gene) and *RET/PTC3* (resulting from the fusion of *RET* with the *RFG* gene) are by far the 2 most common of the *RET* rearrangements (reviewed in Santoro et al, 2004) and their detection could be very useful as markers of malignancy in thyroid nodules diagnosis (Cheung 2001). Therefore, the detection of the *RET* activation in Brazilian patients is of great importance. Hence, the present study aims to estimate the prevalence of *RET/PTC1* and *RET/PTC3* in a group of papillary and follicular tumours from Brazilian patients, using the RT-PCR touchdown-nested strategy. We also studied *RET* activation analysing the tyrosine kinase domain expression. We intend with the obtained results, to evaluate the use of these molecular analysis in diagnosis of thyroid nodules in Brazilian patients.

Material and Methods

Patients and Tumour Samples

Thyroid tumour samples were obtained from patients admitted for thyroid surgery in three institutions: HUPE–UERJ (Rio de Janeiro), HUCFF-UFRJ (Rio de Janeiro) and UNI-CAMP (Campinas-SP), from 1999 to 2000. Patients' data were obtained from the Hospital registries. The tumour samples were collected and immediately frozen in Liquid Nitrogen before storage at -70°C. Thirty thyroid tumours were analyzed: 14 papillary carcinomas, 3 follicular carcinomas and 13 benign nodules. Tumour type was designated by a pathologist and reviewed by a second one. All the procedures and analysis were done in accord to the Ethic Committee of HUPE.

RET Activation by RET/PTC expression analysis

The *RET* activation in the thyroid tumors was assessed by the determination of *RET/PTC1* and *RET/PTC3* rearrangements and TK-domain expression. We used the RT-PCR nested strategy associated to a “touchdown” technique to detect the rearranged *RET/PTC1* and *RET/PTC3* (Fusco et al 2002). The sequence of the primers used in this study is presented in Table 1. *GAPDH* was used as a positive control for PCR reactions. Briefly, total RNA was isolated from 100 µg of selected thyroid tumour samples using Trizol (Life Technologies) and 400 ng were subjected to first strand cDNA synthesis using a system of Random primers (Hexamers) and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). For PCR, 1 µl of the cDNA template was utilized for the first round of amplification with the external primer set. After a 5-minutes hot start at 94°C, 2 cycles of amplification (94°C for 30 seconds, 61°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds), nine cycles of “touchdown” amplification were performed (progressively lowering the annealing temperature from 60°C to 56°C), followed by 42 cycles of amplification (94°C for 30 seconds, 55°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds). For the second round of amplification, 1 µl of first round PCR product was utilized, with the internal primer sets, following the same reaction conditions described for the first round of amplification. The nested RT-PCR products for *RET/PTC1* and *RET/PTC3* were analysed on 3 % agarose gels. We used as negative controls, the amplification of cDNA obtained in the absence of Reverse Transcriptase, obtained from the total RNA extracted from normal human mammary cell or in the absence of cDNA. As positive controls, we utilized the cell line PTC-

1 (Dr. M.Pierrotti, Milano, Italy) for *RET*/PTC1, and tumour T10 cDNA for *RET*/PTC3 after confirmation by sequencing.

RET activation by Tyrosine Kinase-Domain expression analysis

RET activation was evaluated by RT-PCR directed to the tyrosine kinase domain (TK-Domain) using a multiplex assay. *GAPDH* was used as a positive control for PCR reactions and thyroglobulin (*THYRO*) as an internal control because it is specifically expressed in thyroid follicular cells. Briefly, for PCR, 1 µl of the cDNA template was utilized for amplification with two primer sets, for *THYRO* and TK-Domain (Table 1). After a 5 minutes hot start at 94°C, 2 cycles of amplification (94°C for 30 seconds, 61°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds), nine cycles of “touchdown” amplification was performed (progressively lowering the annealing temperature from 60°C to 56°C), followed by 42 cycles of amplification (94°C for 30 seconds, 55°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds). The RT-PCR products for TK-Domain were analysed on a 6 % polyacrilamide gel.

Results

Thirty thyroid tumours were analyzed: 14 papillary carcinomas, 3 follicular carcinomas and 13 benign nodules. Included in the papillary carcinomas were two cases of follicular variant of papillary carcinoma (cases numbers 12 and 14). Patients' mean age was 35 and 80% were female. We observed that 35.7% of the 14 studied papillary carcinomas were positive for *RET*/PTC1 or *RET*/PTC3 (Table 2). One case presented *RET*/PTC1 (7.1%), 3 cases presented *RET*/PTC3 (24%) and one case presented both rearrangements (7.1%). None of the follicular carcinomas had *RET*/PTC expression. In relation to *RET* activation assessed by the expression of TK-Domain, the results showed that the papillary carcinomas and the benign nodules presented some activity. The results obtained showed that: 12 of 14 papillary carcinomas (85.7%) and 7 of 13 benign nodules (53.8%) were positive (Table 2). All cases which presented *RET* rearrangements presented the TK-Domain positive and none of the follicular carcinomas presented this activity. In relation to clinical-pathological characteristics, the patients that presented tumor bearing rearranged *RET* showed some aggressive characteristics such as stage 3 and tumor size >5 cm, as observed in Table 3. Interestingly, the tumor from patient 12, initially classified as follicular carcinoma, presented *RET*/PTC1 expression. A

second morphological analysis showed that, in fact, it was a follicular variant of papillary carcinoma.

Discussion

The search of definitive molecular markers in thyroid cancer is a challenge (Baloch and LiVolsi 2002). At the side of *BRAF* point mutations, the *RET* rearrangements *RET/PTC1* and *RET/PTC3* are important indicators of malignancy and, their use as tools to help thyroid nodule diagnosis, have been proposed (Cheung et al 2001; Salvatore et al 2004; Tallini and Brandão 2005). In Brazil the prevalence of such gene mutation is not known. The present work aimed to study the frequency of *RET* rearrangements (*RET/PTC1* and *RET/PTC3*) in a group of papillary and follicular thyroid carcinomas from Brazilian patients. We also searched to determine the *RET* activation by means of the expression of its TK-Domain, which corresponds to the part of the gene that is unchanged during the occurrence of the rearrangement, in order to obtain additional information about *RET* RNA expression. Our results showed a frequency of 35.7% of papillary carcinomas presenting rearranged *RET* what is accordance with the literature (Fagin 2005). We found that 7.1% were *RET/PTC1*, 21.4% were *RET/PTC3* and 7.1% presented both rearrangements. As described by Rhoden (Rhoden et al 2004) the frequency of PTC rearrangements is largely different among the different studies, ranging from zero to 60%, in cases not related to radiation exposition. These authors showed that, apart from the specific characteristics of the studied series of cases, these variations should be linked to the different methods applied to evaluate *RET* rearrangements. In the present study we used the methodology described by Fusco et al, 2002, which utilized a nested PCR associated to a touchdown technique. This method showed to be, in our laboratory, more sensitive than the commonly RT-PCR (data not shown). The TK-Domain expression was evaluated in the same reaction, with a multiplex assay with thyroglobulin expression (*THYRO*), a gene specifically expressed in the thyrocytes. It was used as an internal control and the correspondent band intensity was identical into the same experiment, showing that the *THYRO* expression was very similar in the analyzed samples. Besides, it demonstrates that the negativity of TK-Domain expression was due to the absence of RNA expression and not due to poor RNA extraction. With this determination we aimed to reach a direct relation with the thyroid follicular cells in order to futurely utilize this methodology in molecular analysis of fine needle aspiration biopsies (FNAB). In FNAB, the contamination with other tissues other than thyroid might counfound the results. Fine needle aspiration

biopsia is the best method to evaluate clinically the thyroid nodule and, an association with molecular analysis is very suitable (Cheung et al 2001; Salvatore et al 2004). This approach will be utilized in the continuation of the present work. As described in Table 2, the different analyzed tumor types presented, in some extent, TK-Domain expression. However, it is clear that papillary carcinomas showed more positivity than the other analyzed types of tumors (85.7%). Another important observation is that, as expected, all tumors with rearranged *RET* were positive for TK-Domain expression although the contrary was not found: the tumors without *RET/PTC1* or *RET/PTC3* presented TK-Domain activity. It may be explained by the existence of other types of *RET* rearrangements which could be expressed in the papillary tumors. Several studies analysed RET protein expression using immunohistochemistry. Most of them, concluded that it could not be used as a marker of malignant thyroid tumors (Cerilli et al 2002; Rhoden et al 2004) . We detected *RET*-TK-Domain expression in both malignant and benign thyroid tumors. This observation could be related to the presence, in the analyzed tissues, of C-cells or of macrophages and neutrophils which could bear this activity (Gattei et al 1997). Besides, the possibility of a basal expression of *RET* in follicular thyroid cells is being recently considered (Rhoden et al 2004). We are investigating this point in our laboratory. Some thyroid tumor tissues may present different histological types. These observations reflect the complexity of the thyroid carcinogenesis, including multiclonality, with different clones owing different gene mutations (Sugg et al 1998; Fusco et al 2002). We found a case, patient number 40, who presented both rearrangements. The patient was male, 47 years-old, the tumor was larger than 5cm and classified of stage 3. It was then, a papillary thyroid carcinoma with aggressive characteristics (Table 3). This type of observation was described by other authors (Tallini et al 1998; Sugg et al 1998; Chua et al 2000). Another tumor, from patient number 12, was misclassified as follicular carcinoma and the molecular analysis showed *RET/PTC3* rearrangement. The pathologic diagnosis was revised and, in fact, it was a papillary carcinoma follicular variant. Recently Cristofaro et al, 2006, published a study where the determination of *RET* rearrangements, *RAS* mutation at codon 61 and *BRAF* mutation in residue 600, is of great importance to understand thyroid carcinogenesis, mainly the aggressive and difficult to diagnose the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. The observations presented here reinforce the importance of the molecular approach to help thyroid nodules diagnosis in Brazilian patients.

Acknowledgements

We are grateful to all staff of the Hospital Pedro Ernesto for the kind cooperation in obtaining surgical tumor samples. This work was supported by FAPERJ and UERJ.

References

Baloch ZW, LiVolsi A, 2002. The quest for a magic tumor marker. *Am J Clin Pathol*, 118: 165-166.

Cerilli LA, Mills SE, Rumpel CA, et al. 2002. Interpretation of RET immunostaining in follicular lesions of the thyroid. *Am J Clin Pathol*, 118: 186-193.

Cheung C, Carydis B, Ezzat S, et al. 2001. Analysis of ret/PTC rearrangement refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 2187-90.

Chua EL, Wu WM, Tran KT, et al. 2000. Prevalence and distribution of ret/ptc 1, 2, and 3 in papillary thyroid carcinoma in New Caledonia and Australia. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:2733-9.

Coeli CM, Brito AS, Ribeiro MG, et al. 2005. Incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil. *Arqu Bras End Met*, 49: 503-9.

Fagin JA 2005 Genetics of papillary thyroid cancer initiation: implications for therapy. *Transac Am Clin Climatol Assoc*, 116: 259-71.

Fusco A, Grieco M, Santoro M, et al. 1987. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymphnodal metastases. *Nature*, 328: 170-172.

Fusco A, Chiappetta G, Hui P, et al. 2002. Assessment of RET/PTC activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma – a search for precursors of papillary cancer. *Am J Pathol*, 160: 2157-67.

Gattei V, Celetti A, Cerrato A, et al. 1997. Expression of the RET receptor tyrosine kinase and GDNFR-alpha in normal and leukemic human hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow microenvironment. *Blood*, 89: 2925-2937.

Gimm O. 2001. Thyroid cancer. *Cancer Letters*, 163: 143-156.

Jhiang SM. 2000. The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene*, 19:5590-7.

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

Rhoden KJ, Johnson C, Brandao G, et al. 2004. Real-Time quantitative RT-PCR identifies distinct c-RET, RET/PTC1 and RET/PTC3 expression patterns in papillary thyroid carcinoma. *Lab Invest*, 84:1557-1570.

Santoro M, Chiapetta G, Cerrato A, et al. 1996. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene transgenic mice. *Oncogene*, 12: 1821-6.

Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, et al. 2004. Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinol*, 145: 5448–51.

Salvatore G, Giannini R, Faviana P, et al. 2004. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Met*, 89: 5175-80.

Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, et al. 1998. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Met*, 83: 4116-22.

Tallini G, Santoro M, Helie M, et al. 1998. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res*, 4:287-94.

Tallini G, Brandao G, 2005 Assesment of RET/PTC oncogene activation in thyroid nodules utilizing laser microdissection followed by nested RT-PCR. *Methods Mol Biol* 293: 103-11.

Viglietto G, Chiapetta G, Matinez-Tello FJ, et al. 1995. RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene*, 11:1207-10.

Table 1 - Primer sequences utilized in *RET/PTC* and TK-Domain RT-PCR analysis and their expected product sizes (as described in Fusco et al, 2002).

Primers name	Sequences	Expected product
c-RET(-) EX	5'-CTT TCA GCA TCT TCA CGG-3'	
PTC1 (+) EX	5'-ATT GTC ATC TCG CCG TTC-3'	307 bp
PTC3 (+) EX	5'AAG CAA ACC TGC CAG TGG-3'	242 bp
c-RET (-) IN	5'-TTC GCC TTC TCC TAG AGT-3'	
PTC1 (+) IN	5'-GCA AAG CCA GCG TTA CC-3'	86 bp
PTC3 (+) IN	5'-CCC GAG GAC TGG CTT ATC-3'	111 bp
TK/ret (+)	5'-CTT GTC CCG AGA TGT TTA TG-3'	107 bp
TK/ret (-)	5'-TGG TGT AGA TAT GAT CAA AAA-3'	
THYRO (+)	5'-GTT GGC AAC CTC ATC GT-3'	660bp
THYRO (-)	5'-AAT TCT GCA GTG CCT GGT-3'	
GAPDH (+)	5'-TCTCATGGTTCACACCCATGACGAACATG-3'	450bp
GAPDH (-)	5'AAGAAAGATGCGGCTGACTGTCGAGCCCACT-3'	

Table 2 – Results obtained with RET/PTC1, RET/PTC3 and TK-Domain expression analysis of Brazilian thyroid malignant and benign tumours using RT-PCR.

Tumors	RET/PTC₁	RET/PTC₃	TK-DOMAIN
Papillary			
3	-	-	+
5	-	+	+
10	-	+	+
12*	-	+	+
14*	-	-	+
19	+	-	+
23	-	-	+
25	-	-	+
26	-	-	+
29	-	-	-
30	-	-	+
31	-	-	+
37	-	-	-
40	+	+	+
Follicular			
33	-	-	-
34	-	-	-
38	-	-	-
Benign			
4	NR	NR	-
6	NR	NR	-
13	NR	NR	+
17	NR	NR	-
41	NR	NR	-
42	NR	NR	-
43	NR	NR	+
49	NR	NR	-
50	NR	NR	+
51	NR	NR	+
52	NR	NR	+
53	NR	NR	+
54	NR	NR	+

* follicular variant of papillary carcinoma; NR – not realized.

Table 3 - Clinico-pathological characteristics of patients presenting RET/PTC rearrangement.

Patient	Gender	Age	Stage	Tumor size (cm)	RET/PTC
5	F	37	3	>5.0	3
12	F	38	2	>3.0	3
40	M	47	3	>5.0	1 and 3
10	M	32	-	-	3
19	F	43	-	1.3	1

ANEXO 2

Artigo em Preparação

Molecular evaluation of anaplastic thyroid carcinomas from Rio de Janeiro, Brazil.

Tatiana Perecmanis^a; Silvia Loiola^b; Valeria Regina de Moura Castro^b; Gabriella Marfê^c; Paola Sinibaldi^c; Jodelia M..M.Henriques^a; Carlos Alberto Basílio de Oliveira^d; Paulo Mario F. Oliveira^a; Claudia Vitoria de Moura Gallo^{b,*}

^a Departamento de Endocrinologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Departamento de Biologia Celular e Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^c Department of Experimental Medicine and Biochemical Science, University of Roma “Tor Vergata” , Roma, Italy

^d Departamento de Patologia , Hospital Gaffrée e Günle, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Submitted to: Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Key words: Anaplastic thyroid cancer; *TP53* mutation; p53 expression; *RET* activation

*Corresponding author: Rua São Francisco Xavier, 524, 2º andar, Maracanã, Rio de Janeiro
CEP: 20.550-013 Tel.: 55-21-2587-7567; fax: 55-21-2587-7377. *E-mail address:*
cgallo@uerj.br

Abstract

Anaplastic thyroid carcinoma is an aggressive and invasive malignant neoplasm with high index of mortality and short survival after diagnosis. This type of neoplasm is rather rare and in the present work we report an unusual relative high frequency: four cases of anaplastic carcinoma of the thyroid were diagnosed in a total of 17 thyroid carcinomas (23.5%), in a period of 24 months, from 1999 to 2000. Two of the four patients presented history of hyperthyroidism due to Graves' disease and showed thyroid-stimulating hormone (TSH) suppressed. The molecular investigation showed p53 protein accumulated although we did not detect any mutation in exons 5 to 8 of *TP53* gene. Interestingly we observed that 50% of these tumors presented *RET* activation through *RET/PTC₃* rearrangements, showing that they possibly originated from papillary carcinomas.

Introduction

Anaplastic thyroid carcinoma is an aggressive and invasive malignant neoplasm with high index of mortality and short survival after diagnosis. This type of neoplasm is rather rare and represents less than 5% of all malignant thyroid tumors in the USA (1) with a prevalence of 2% (2). In Brazil, there is no epidemiological study describing precisely the frequency and importance of this type of cancer. The clinical evolution of anaplastic thyroid tumors shows different pathological behaviours: about 50% of the patients have no thyroid abnormalities detected previously and the other 50% have history of goiter or differentiated thyroid carcinoma that suddenly develops a very aggressive disease. At the molecular level, key-genes are differently altered in the different types of thyroid tumors. The oncogenic activation of *RET*, *BRAF* and *RAS* is involved in papillary carcinomas while the activation of *RAS* and *PAX8-PPAR γ* is associated to follicular carcinomas (3). Both are considered as well-differentiated malignant tumor types. The passage from a well-differentiated (papillary and follicular) to an undifferentiated neoplasia (anaplastic) has an important turning point where the tumor suppressor protein p53 seems to be implicated (4). P53 is activated in response to genomic damage resulting in anti-proliferative effects and in preservation of genomic integrity. Thus, the disruption of its activity is an important step in cancer development (5,6). As expected, the gene *TP53* is frequently mutated in human cancers and the presence of the altered protein is frequently observed in poorly differentiated thyroid tumors (7-9). The study of gene alterations in anaplastic thyroid carcinomas should, then, provide clues to understand the evolution of this aggressive tumor. In the present work we report an unusual relative high frequency of anaplastic carcinomas among thyroid tumors registered in the Hospital Pedro Ernesto (HUPE), Rio de Janeiro, in a period of two years. We investigated the presence of alterations in *TP53* and *RET* in order to understand the etiology of these cases and we discuss the role of *RET* in these undifferentiated tumors.

Material and Methods

Patients and specimens

The four patients analyzed in this study were admitted for surgery during the period of 24 months, from 1999 to 2000 in the Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). All of them presented a very aggressive disease with a large goiter showing evident local spread, hard consistency and multiple cervical adenomegalies. They had histological diagnosis of

anaplastic thyroid cancer and the relative frequency of the anaplastic cases was calculated in relation to the total of patients presenting thyroid malignant tumors. The patient's data were collected from the hospital registries and all procedures done were approved by the Ethic Committee of the HUPE.

TP53 mutation analysis

DNA isolation, PCR-SSCP and sequencing

Genomic DNA was prepared from frozen tumor samples by proteinase K (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) digestion and phenol/chloroform extraction according to standard procedures (10). Exons 5 to 8 of the *TP53* gene were amplified using intronic primers pairs as described elsewhere (11). Briefly, PCR reaction was carried out with 100ng of genomic DNA, 20 pmol of each primer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.16 mM of dNTPs (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 1.0 U Tth DNA polymerase (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, Spain) in a final volume of 50 µl. PCR cycling conditions were: initial 5 min denaturation step at 94°C, followed by 35 cycles [each cycle was 94°C for 30 s; 61°C (exons 5 and 6), 60°C(exon 7) or 58°C (exon 8) for 1 min; 72°C for 1 min], and a terminal extension at 72 °C for 10 min in an MJ thermocycler. For the SSCP analysis, 3.0 µl of PCR products were added to a 6.0 µl final volume of formamide denaturing buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol) and heated at 95°C for 10 min. This denatured DNA mixture (9 µl) was loaded onto a non-denaturing 8% polyacrylamide gel. Gels were run with 1x Tris-borate-EDTA buffer at 3.7 V/cm for about 18 hours and stained with silver nitrate (12). Tumor samples showing altered bands in two independent PCR-SSCPs were considered possibly mutated. In order to confirm PCR-SSCP results, all the amplified fragments correspondent to exons 5, 6, 7 and 8 of all 4 tumors were sequenced with ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) after purification with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, USA).

P53 immunohistochemistry

Immunohistochemistry staining was performed as follows: 5 µm thick sections were deparaffinized, treated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity, then treated with citrate buffer (pH 6.0) for 40 minutes at 98°C, for antigen retrieval. After

achieve the room temperature all sections were incubated with BSA 1% for 20 minutes and then incubated overnight with primary antibody anti-p53 CLONE/KLON DO-7 (DAKO Japan Co., Kyoto, Japan) and stained using the Ultrastreptavidin HRP AEC Detection Kit (Signet™ Laboratories, Dedham, MA, USA). The sections were counterstained with Harris hematoxylin. Brown nuclear stain was considered positive and the cells counted to obtain an approximate percentage of positive cells.

RET/PTC expression analysis

The *RET* activation in the four anaplastic thyroid tumors was analysed by the determination of *RET/PTC*₁ and *RET/PTC*₃ rearrangements. We used the RT-PCR nested strategy associated to a “touchdown” technique to detect the rearranged *RET/PTC*₁ and *RET/PTC*₃ (13). The sequence of the primers used in this study is presented in Table 1. *GAPDH* was used as a positive control for RT-PCR reactions. Briefly, total RNA was isolated from 100 mg of selected thyroid tumour samples using Trizol (Life Technologies) and 400 ng were subjected to first strand cDNA synthesis using a system of Random primers (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). For PCR, 2 µl of the cDNA template was utilized for the first round of amplification with the external primer sets. After a 5-minute hot-start at 94°C, 2 cycles of amplification (94°C for 30 s; 61°C for 45 s; 72°C for 45 s), 5 cycles of “touchdown” amplification were performed (progressively lowering the annealing temperature from 60°C to 56°C), followed by 42 cycles of amplification (94°C for 30 s; 55°C for 45 s; 72°C for 45 s) and final extension at 72°C for 10 min in an MJ thermocycler. For the second round of amplification, 1 µl of first round PCR product was utilized with the internal primer sets and the same reaction conditions described for the first amplification round. The nested RT-PCR products for *RET/PTC*₁ and *RET/PTC*₃ were analysed on a 3 % agarose gel. Amplification in the absence of Reverse Transcriptase or the presence of RNA extracted from normal human mammary cells, which lacks *RET/PTC* rearrangement, were used as negative controls. As positive controls, we utilized RNA from the cell line PTC-1 (Dr. M.Pierrotti, Milano, Italy) for *RET/PTC*₁, and tumour T10 cDNA, which the *RET/PTC*₃ fragment was confirmed by sequencing (data not shown).

Results

Four cases of anaplastic carcinoma of the thyroid were diagnosed in a total of 17 thyroid carcinomas (23.5%) in a period of 24 months, from 1999 to 2000. Patient's age, TSH levels and the observed gene mutations of the studied cases are described in the Table 2. The mean age of the patients was 66.2 ± 4.8 . All patients were female and had a very aggressive presentation, with evident local spread and cervical adenomegalies. Two of them (patients numbers 15 and 24) had history of hyperthyroidism due to Graves' disease and showed TSH suppressed (Table 2). One was under treatment with antithyroid drug and the other was not. The other two patients (numbers 2 and 20), did not refer to any thyroid pathologic problem and had normal levels of TSH. No association could be observed with economic activity, ethnicity, alimentary habits, geographic origin or toxic exposition. All patients died from the disease into one year. The four anaplastic thyroid tumors were screened for *TP53* mutations, p53 expression by immunohistochemistry and *RET/PTC₁* and *RET/PTC₃* rearrangements by RT-PCR. The *TP53* mutation analysis was performed with PCR-SSCP and sequencing in exons 5, 6, 7 and 8. None of the studied tumors presented any mutation in the four analyzed exons. The immunohistochemistry analysis of three anaplastic tumors (cases number 2, 15 and 20) showed a high level of p53 expression presenting at least 50% of the cells stained for p53 (Figure 1). In relation to the *RET/PTC* activation analysis, we observed that 2 of the 4 tumors (50%) presented *RET* activation (Figure 2) and both had *RET/PTC₃* rearrangement (Table 2). *GAPDH* analysis was done and testified the RNA quality (data not shown).

Discussion

In the present work we investigated 4 cases of anaplastic thyroid tumors diagnosed in the HUPE, a Hospital situated in Rio de Janeiro. This type of cancer is rather rare, a prevalence of 2% (2) and a report of 4 cases in a total 17 thyroid cancer (23.5%) in a period of 24 months shows an unusual frequency. The mean age of the patients was 66.25 years, what is in accordance with the literature (14). The analysis of available epidemiological data of the 4 patients did not show any special clue which could explain the unusual frequency. Interestingly, we observed TSH suppressed in 50% of patients (2 of 4 patients), who had reported previous history of hyperthyroidism due to Graves' disease. Belfiore et al (15) observed a 2-3 fold increased risk of thyroid cancer in Graves' disease. Pellegriti et al (16) concluded that metastasis and cancer-related death were more common in Grave's cancer

patients. In a multicentre study, Kraimps et al (17) have showed that patients submitted to thyroidectomy for Graves' disease, presented thyroid carcinoma in a rate of 3.8% and, at least two cases of association between Graves' disease and anaplastic carcinoma of the thyroid were reported in the literature (18,19). As reviewed by Belfiore et al (20) the auto-antibodies activation of TSH receptor (TSHR) in Graves' disease have a hyperplastic stimuli for the thyroid follicular cell being involved in thyroid cancer, at least raising its incidence. Although some reports show normal or low incidence of thyroid cancer in Graves' disease, most of them indicate a significant association, ranging from 3 to 10%. The activating antibodies may promote tumor growth by direct and indirect effects depending if they act directly on TSHR or via TSH upregulation of the expression of insulin receptors and vascular endothelial growth factors, leading to cell growth and angiogenesis (20). It is reasonable then to suppose that these growth stimuli could facilitate the appearance of genetic mutational events as, for example, in the tumor suppressor gene *TP53*. In the studied cases we did not find any mutation in the analyzed exons of *TP53*, however, we observed p53 accumulation in 3 analyzed tumors.

In thyroid cancer, p53 inactivation by mutations is probably not associated with the malignant conversion *per se* but could contribute with the further progression to a more aggressive neoplasia (21,4). According to this hypothesis, it would be expected that *TP53* mutations should occur frequently in undifferentiated (anaplastic) thyroid cancer. Several studies have demonstrated a low frequency of *TP53* mutation in well differentiated papillary and follicular thyroid cancer and high frequency in undifferentiated anaplastic cancer (22,7)). However, Zou et al (23) have described the presence of *TP53* mutation in all pathologic types and clinical stages of thyroid carcinoma (23) and Ho et al (24) have reported no mutation in 4 studied anaplastic tumors. This discrepancy could be explained by differences of the applied methods of mutation detection. In fact, some reports were based on immunohistochemical assays (25), which is less sensitive than molecular analysis to detect *TP53* mutations. In the present work we showed that none of the four analyzed anaplastic tumors presented mutations in *TP53*. Otherwise, the protein expression analysis in our samples, using immunohistochemistry, showed that more than 50% of the cells were stained for p53. These observations indicate that p53 was activated and is probably, somehow, taking part of the tumor cell development. It is possible that p53 has accumulated by a mechanism different from the presence of deleterious mutations and the impairment of its activity due to other cell alterations. Horie et al (26) has reported the overexpression of *MDM2* in papillary carcinomas

which acts impeding p53 activity. Thus, it is possible that p53 functions are disturbed in our samples by different mechanisms than mutational events in *TP53*. We are currently investigating this possibility. At other side, considering studies that show evidences of a pre-existing thyroid well differentiated neoplasia and a sudden change in its behaviour, we started to analyze other important gene alterations in the progress of thyroid neoplastic process. The *RET* gene is a key-gene in the genesis of thyroid tumors. The rearranged forms of *RET* have been considered as hallmarkers of papillary thyroid carcinoma and its prevalence varies from zero to 60% of no related radiation exposition cases. These variations could be associated to intrinsic factors of the different populations or, as indicated by Rhoden et al (27), to the different sensitivity of the applied methods. We utilized the methodology described by Fusco et al (13) which is based in nested PCR associated to the touchdown technique. In our laboratory this strategy showed to be more sensitive than the commonly utilized RT-PCR (data not shown). Two of the 4 anaplastic tumors (50%) presented rearranged *RET* and they were *RET/PTC3*. It is generally accepted that tumors bearing *RET/PTC* do not necessarily progress to an undifferentiated phenotype (28), however, it was demonstrated that transgenic mice bearing *RET/PTC₁* develop anaplastic tumors when p53 is not functional (29). Our results suggest an important participation of the *RET* activation in the development of these tumors which were collected from patients of the same geographical region (the State of Rio de Janeiro) and at the same period of time, a two years-period from 1999 to 2000. It is very possible that these aggressive tumors have originated from papillary carcinomas. We may also suppose that the studied thyroid anaplastic samples had regions of well-differentiated papillary carcinoma. It was reported by Hunt et al (30) and it could explain the presence of *RET/PTC₃* in our samples. In this case, the papillary carcinoma developed in the initial steps of the tumor, may coexist with regions of anaplastic growth and, the anaplastic regions could bear a sort of p53 function impairment resulting in the aggressive phenotype. Such possibilities are presently being tested in our laboratory.

Acknowledgements

The authors would like to thank the helpful assistance of the HUPE staff in obtaining tumor samples. We also thank Dr. Julio Paixão for technical discussions. This work was supported by FAPERJ.

References

1. Pasiëka JL. Anaplastic thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* 2003; 15(1): 78-83.
2. Kondo T, Ezzat S, Asa, SL. Pathogenic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 292-306.
3. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol* 2004; 15(4): 319-327.
4. Gimm O. Thyroid cancer. *Cancer Lett* 2001; 163(2): 143-156.
5. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 81-137.
6. De Moura Gallo CV, Azevedo E Silva Mendonça G, De Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res* 2005; 589(3):192-207.
7. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1993; 91(4): 1753-1760.
8. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993; 91(1): 179-184.
9. Shahedian B, Shi Y, Zou M, Farid NR. Thyroid carcinoma is characterized by genomic instability: evidence from p53 mutations. *Mol Genet Metab* 2001; 72(2): 155-163.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning - Laboratory manuals. 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
11. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5(4): 874-879.
12. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17(5): 914-921.
13. Fusco A, Chiappetta G, Hui P, Garcia-Rostan G, Golden L, Kinder, et al. Assessment of RET/PTC oncogene activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma: a search for the early precursors of papillary cancer. *Am J Pathol* 2002; 160(6): 2157-2167.

14. Brocheriou C. Anaplastic carcinoma of the thyroid. *Arch Anat Cytol Pathol* 1998; 46(1-2): 87-93.
15. Belfiore A, Garofalo M, Giuffrida D, Runello F, Filetti S, Fiumara A, et al. Increased aggressiveness of thyroid cancer in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(4): 830-835.
16. Pellegriti G, Belfiore A, Giuffrida D, Lupo L, Vigneri R. Outcome of differentiated cancer in Grave's patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(8): 2805-2809.
17. Kraimps JL, Bouin-Pineau MH, Mathonnet M, De Calan L, Ronceray J, Visset J, et al. Multicentre study of thyroid nodules in patients with Graves' disease. *Br Surg* 2001; 87(8): 1111-1113.
18. Majima T, Komatsu Y, Doi K, Shigemoto M, Takagi C, Fukao A, et al. Anaplastic thyroid carcinoma associated with Graves' disease. *Endocrinology Journal* 2005; 52(5): 551-557.
19. Fujikawa M, Okamura K, Sato K, Asano T, Yamasaki K, Hirata T, et al. Anaplastic transformation of a papillary carcinoma of the thyroid in a patient with Graves' disease with varied activity of thyrotropin receptor antibodies. *Thyroid* 1998; 8(1): 53-58.
20. Belfiore A, Russo D, Vigneri R, Filetti S. Grave's disease, thyroid nodules and thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2001; 55(6): 711-718.
21. Wynford-Thomas D, Blaydes J. The influence of cell context on the selection pressure for p53 mutation in human cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19(1): 29-36.
22. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, et al. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 1992; 52(5): 1369-1371.
23. Zou M, Shi Y, Farid NR. p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(4):1054-1058.
24. Ho YS, Tseng SC, Chin, TY, Hsieh LL, Lin JD. p53 gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 1996; 103(1): 57-63.
25. Lam KY, Lo CY, Chan KW, Wan KY. Insular and anaplastic carcinoma of the thyroid: a 45-year comparative study at a single institution and a review of the significance of p53 and p21. *Ann Surg* 2000; 231(3): 329-338.
26. Horie S, Maeta H, Endo K, Ueta T, Takashima K, Terada T. Overexpression of p53 protein and MDM2 in papillary carcinomas of the thyroid: Correlations with clinicopathologic features. *Pathol In* 2001; 51(1): 11-15.

27. Rhoden KJ, Johnson C, Brandao G, Howe JG, Smith BR, Tallini G. Real-time quantitative RT-PCR identifies distinct c-RET, RET/PTC1 and RET/PTC3 expression patterns in papillary thyroid carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84(12):1557-1570.
28. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5):2414-2420.
29. La Perle KM, Jhiang SM, Capen CC. Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in RET/PTC1-induced thyroid carcinomas. *Am J Pathol* 2000; 157(2): 671-677.
30. Hunt JL, Tometsko M, LiVolsi VA, Swalsky P, Finkelstein SD, Barnes EL. Molecular evidence of anaplastic transformation in coexisting well-differentiated and anaplastic carcinomas of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(12):1559-1564.

Table 1. Primer sequences and the expected product sizes, based in Fusco et al, 2002.

Primers name	Sequences	Expected product (bp)
c-RET(-) EX	5'-CTT TCA GCA TCT TCA CGG-3'	
PTC1 (+) EX	5'-ATT GTC ATC TCG CCG TTC-3'	307
PTC3 (+) EX	5'AAG CAA ACC TGC CAG TGG-3'	242
c-RET (-) IN	5'-TTC GCC TTC TCC TAG AGT-3'	
PTC1 (+) IN	5'-GCA AAG CCA GCG TTA CC-3'	86
PTC3 (+) IN	5'-CCC GAG GAC TGG CTT ATC-3'	111
GAPDH (+)	5'-TCTCATGGTTCACACCCATGACGAACATG-3'	
GAPDH (-)	5'AAGAAAGATGCGGCTGACTGTCGAGCCCACT-3'	450

Table 2. Patient's age, TSH levels and *TP53*, *RET/PTC1* and *RET/PTC3* mutation analysis of the anaplastic cases.

Case number	Age (years)	TSH	<i>TP53</i> mutation	<i>RET/PTC1</i>	<i>RET/PTC3</i>
02	71	4.13	Neg	Neg	Pos
15	72	0.03	Neg	Neg	Pos
20	61	2.49	Neg	Neg	Neg

24

61

0.09

Neg

Neg

Neg

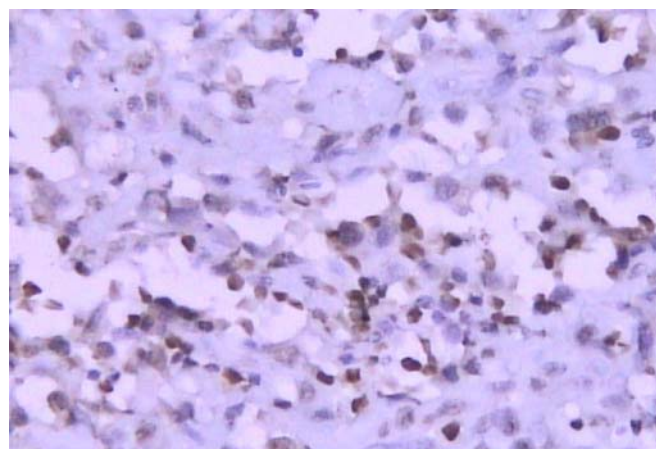


Figure 1

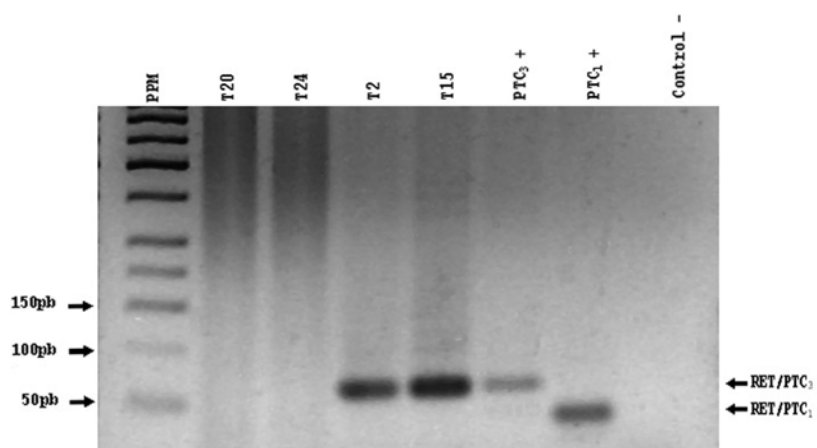


Figure 2

Figure 1. Immunohistochemical staining of p53 of Tumor 15. More than 50% of the cells are stained by p53.

Figure 2. *RET- PTC* rearrangement expression of the anaplastic thyroid carcinomas. Analysis using the RT-PCR nested strategy associated to a “touchdown” technique. Lane1 – molecular weight; Lane 2-5 anaplastic carcinomas numbers 2, 15, 20 and 24; Lane 6 – *RET/PTC₁* and *RET/PTC₃* negative controls; Lane 7 – *RET/PTC₃* positive control; Lane 8– *RET/PTC₁* positive control

ANEXO 3

LISTA DE REAGENTES E FABRICANTES

REAGENTE	FABRICANTE
Acetato de sódio	MERCK
Ácido acético	MERCK
Ácido bórico	MERCK
Ácido clorídrico (HCl)	MERCK
Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA)	MERCK
Acrilamida	PHARMACIA
Agarose	INVITROGEN
Azul de bromofenol	VETEC
Bis-acrilamida	PHARMACIA
Brometo de etídeo	BIOAGENCY
Carbonato de sódio anidro	MERCK
Cloreto de sódio (NaCl)	MERCK
Clorofórmio	MERCK
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	INVITROGEN
Etanol absoluto	MERCK
Fenol	INVITROGEN
Formaldeído	MERCK
Formamida	MERCK
Glicerol	MERCK
Glicogênio	USB
N'N'N'N' tetrametiletilenodiamina (TEMED)	MERCK
Nitrato de prata	MERCK
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	MERCK
Persulfato de amônio (APS)	USB
Proteinase K	GIBCO BRL
Tiosulfato de sódio	MERCK
Trihidroxi-metil-amino-metano (Tris)	INVITROGEN
Xileno	MERCK
Xileno cianol	AMRESCO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)