

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Genes codificantes de peptídeos específicos em doenças  
benignas e malignas da tireóide: Análise por imuno-  
histoquímica**

**DANIEL HARDY MELO**

**Ribeirão Preto  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**DANIEL HARDY MELO**

**Genes codificantes de peptídeos específicos em doenças  
benignas e malignas da tireóide: Análise por imuno-  
histoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

**Orientador:** Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede

**Ribeirão Preto**

**2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Melo, Daniel Hardy

Genes codificantes de peptídeos específicos em doenças benignas e malignas da tireóide: Análise por imuno-histoquímica

Ribeirão Preto, 2008.

106p.: il.; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Programa: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientador: Mamede, Rui Celso Martins

1. Nódulo da Glândula Tireóide; 2. Neoplasias da Glândula Tireóide; 3. Marcadores Biológicos de Tumor; 4. Imuno-histoquímica.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Hardy Melo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

**Área de Concentração:** Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Luis e Regina, alicerces da minha vida, exemplos de dedicação, amor e carinho. Agradeço pela minha formação pessoal e por ensinarem os verdadeiros valores.

À minha esposa Loíse, pelo apoio e compreensão durante todos os momentos da execução deste trabalho e nos momentos de ausência, mas, sobretudo pelo seu amor.

À minha irmã Aline e minhas sobrinhas Lib e Uli, pela amizade e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Professor Dr. Rui Celso Martins Mamede**, Professor Titular do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço - FMRP-USP, pelo seu apoio, confiança e por me facultar a oportunidade de vencer mais uma etapa em minha carreira, a minha gratidão eterna.

Aos **Profs. Drs. Francisco Veríssimo de Mello Filho e Hilton Marcos Alves Ricz**, pelos ensinamentos e constantes estímulos para evolução de meu conhecimento.

Aos **Profs. Drs. Marco Antônio Zago e Luciano Neder Serafini**, pela contribuição inestimável ao andamento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcos Roberto Tavares**, pela colaboração no enriquecimento deste trabalho com suas valorosas observações e participação na banca examinadora.

Aos **Profs. Drs. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro e Carlos Alberto Flores (em memória)**, pelos ensinamentos e pelas oportunidades acadêmicas e de pesquisa.

Ao **Dr. Fabiano P. Saggioro** pela importante ajuda na leitura das lâminas.

Aos médicos assistentes **Marco Antônio Chahud Sabsud, João Virgílio Piton Francese, Gerson Felisbino dos Reis, Lineu Celso Vigário, Luis Carlos Conti de Freitas e Gustavo Cavalvanti Dutra Eichenberger** pela amizade, apoio e formação acadêmica.

Aos amigos **Dr. José Raphael de Moura Campos Montoro e Dr. André Silva Lucas**, pela amizade e pelos incentivos nos momentos difíceis.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação **Dr. David Livingstone e Dr. Rogério Tiveron**, pelos incentivos na elaboração deste trabalho.

Ao pessoal da secretaria, **Rita, Amélia e Rogério e em especial para a Cecília**, que muito me ajudou na elaboração desta Dissertação.

Aos funcionários do Arquivo de Patologia **Cesar Alberto Brigato Junior e Décio Antônio Barrionovo Filho**, que fizeram toda a recuperação das lâminas e dos blocos de parafina.

À técnica do laboratório **Maria Paula Montiani Scandar** pelo apoio técnico-científico na realização das reações imuno-histoquímicas.

Aos **médicos residentes, ex-residentes e funcionários** da Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMRP-USP, pela amizade.

Ao **Projeto GENCAPO** por todo apoio técnico-científico.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos queridos amigos **Jarbas, Ticiano, Daniel Mazza e Luciana**, pelos constantes incentivos na realização deste trabalho e pela acolhida em suas residências durante minhas idas a Ribeirão Preto.



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

---

<b>AcTg-</b>	anticorpo antitireoglobulina
<b>AcTPO-</b>	anticorpo antiperoxidase
<b>AP-</b>	Anatomopatológico
<b>BAGE-</b>	do inglês “B melanoma antigen”
<b>CEC-</b>	carcinoma espinocelular
<b>CECCP-</b>	carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
<b>CITED1-</b>	do inglês “ <b>CBP/p300-Interacting Transactivators with glutamic acid [E] and aspartic acid [D]–rich C-terminal domain 1</b> ”
<b>CK19-</b>	citoqueratina 19
<b>CTA-</b>	do inglês “cancer/testes antigen” - antígenos expressos em câncer e testículos
<b>EGF-</b>	fator de crescimento da epiderme ( <i>epidermal growth factor</i> )
<b>FGF-</b>	fator de crescimento de fibroblastos ( <i>fibroblastic growth-factor</i> )
<b>FMRPUSP-</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<b>FN1-</b>	fibronectina-1
<b>GAGE-</b>	do inglês “G melanoma antigen”
<b>GAL3-</b>	galectina-3
<b>HBME1-</b>	do inglês “Hector Battifora Mesothelial cell”
<b>IGF-</b>	fator de crescimento semelhante à insulina ( <i>insulin-like growth</i> )
<b>LAGE-</b>	do inglês “L-recognized melanoma antigen”
<b>MAGE-</b>	do inglês “melanoma antigen”
<b>MAGE-A4-</b>	do inglês “melanoma antigen gene A4”

<b>MAGE-C1-</b>	do inglês “melanoma antigen gene C1”
<b>MAPK-</b>	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
<b>NY-ESO-1-</b>	do inglês “New York oesophageal squamous cell carcinoma 1”
<b>OMS-</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAAF-</b>	punção aspirativa com agulha fina
<b>Pax8-</b>	do inglês “human paired-box-protein”
<b>PRAME-</b>	do inglês “Preferentially Expressed Antigen of Melanoma”
<b>RIE-</b>	radioimunoensaio
<b>RT-PCR-</b>	do inglês “Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction”
<b>SSX-</b>	do inglês “synovial sarcoma X”
<b>T3-</b>	triiodotironina
<b>T4 Livre-</b>	tiroxina livre
<b>T4-</b>	tiroxina
<b>TGF-</b>	fator de transformação de crescimento ( <i>transforming growth factor</i> )
<b>TRH-</b>	hormônio hipotalâmico liberador de TSH
<b>TSH-</b>	hormônio tireoestimulante - (“thyroid stimulating hormone”)
<b>TTF-1-</b>	Fatores de transcrição específico da tireóide 1
<b>TTF-2-</b>	Fatores de transcrição específico da tireóide 2
<b>USG-</b>	Ultrasonografia

## **LISTA DE FIGURAS**

---

---

- 
- Figura 1-** Microfotografia de amostra de testículo com imunomarcção do antígeno MAGE-A4 pela expressão do anticorpo monoclonal 57B (100x). **(A)** Controles positivo. **(B)** negativo .....55
- Figura 2-** Microfotografia de amostra de testículo com imunomarcção do antígeno MAGE-C1 pela expressão do anticorpo monoclonal CT7-33 (100x). **(A)** Controles positivo. **(B)** negativo .....56
- Figura 3-** Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em b3cio col3ide. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tire3ide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de b3cio col3ide (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de b3cio col3ide com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de b3cio col3ide com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x)..... 61
- Figura 4-** Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em adenoma folicular. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tire3ide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de adenoma folicular (H&E 50x). **(C)** Microfotografia de amostra de adenoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de b3cio col3ide com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x) .....62
- Figura 5-** Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em carcinoma folicular. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tire3ide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x).....65
- Figura 6-** Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em carcinoma papilífero. **(A)**. Microfotografia de amostra de glândula tire3ide normal (H&E, 100x). **(B)**. Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x)....66

## **LISTA DE TABELAS**

---

---

**Tabela 1-** Características demográficas, tumorais e sua relação com a expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 em doenças benignas.....60

**Tabela 2-** Características demográficas, tumorais e sua relação com a expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 em doenças malignas .....63

**RESUMO**

---



---

MELO, D.H. **Genes codificantes de peptídeos específicos em doenças benignas e malignas da tireóide: análise por imuno-histoquímica.** 2008. 106 f. (Dissertação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

**INTRODUÇÃO:** Alguns tumores da tireóide apresentam características histológicas que dificultam a interpretação histopatológica e os critérios diagnósticos usados freqüentemente, são sutis e subjetivos. Assim, análises imuno-histoquímica e de biologia molecular têm sido utilizadas na tentativa de esclarecer o diagnóstico, mas ainda não alcançaram um nível de confiança para serem introduzidas na rotina dos laboratórios de Patologia. Por isso, impõe-se a necessidade de encontrar marcadores mais objetivos para, melhor que a morfologia clássica, caracterizar essas lesões. Dentre esse marcadores, a família MAGE, um grupo de peptídeos antigênicos de tumores apresentados por moléculas HLA classe I e reconhecidos por linfócitos T citotóxicos, expressa-se em cânceres de vários tipos histológicos. Entretanto, o seu papel nas doenças da tireóide é pouco investigado. A presente pesquisa tem a intenção de estudar se a expressão das proteínas MAGE-A4 e MAGE-C1 podem colaborar: (1) no diagnóstico diferencial das doenças foliculares benignas e malignas da glândula tireóide; (2) nas características histológicas do tumor e (3) nas curvas de sobrevida global. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Trata-se de estudo retrospectivo, caso-controle, com 70 casos operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de 1991 a 2005, distribuídos em quatro grupos: 20 bócios adenomatosos, 10 adenomas foliculares, 16 carcinomas foliculares e 24 carcinomas papilíferos. Os critérios de inclusão foram: dados clínicos e macroscópicos disponíveis, representação adequada da lesão, processamento histológico apropriado e disponibilidade de blocos de parafina em boas condições. As análises dos dados clínicos, anatomopatológicos e a imuno-histoquímica dos biomarcadores MAGE-A4 e MAGE-C1 foram realizadas. **RESULTADOS:** No grupo de pacientes com doenças benignas, a proporção entre mulheres e homens foi de 9:1; a média de idade foi de 42,9 anos, com desvio padrão de 9,88 anos e mediana de 43 anos. Na avaliação clínica, podemos observar que o tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de  $3,0 \pm 1,53$  cm (1 a 8cm). Vinte e um casos tinham tumores localizados no lobo D e nove casos no lobo E da glândula tireóide. Ao considerar a casuística para as doenças malignas, a distribuição, segundo o gênero, revelou que 85% dos pacientes eram do sexo feminino, com proporção entre mulheres e homens de 8,5:1,5. A média de idade foi de 48,45 anos, com desvio padrão de 17,0 anos e mediana de 48 anos. Na avaliação clínica, o tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de  $3,63 \pm 1,73$ cm (0,6 a 8 cm). No grupo com carcinoma folicular, a localização do tumor foi predominantemente no lobo direito em relação ao lobo esquerdo (1,5:1). Entre os casos de carcinoma papilífero, a localização do tumor foi, em 25 casos, no lobo esquerdo e em 15, no lobo direito. A invasão angiolímfática foi observada em 37,5% dos pacientes com carcinomas foliculares e em 50% dos pacientes com carcinoma papilífero. Não foi observada imunomarcagem dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1, de qualquer grau de intensidade, em nenhuma das amostras. **DISCUSSÃO:** A

degeneração maligna de tecidos é um processo multifatorial, no qual estão envolvidos elementos genéticos e ambientais em proporções variáveis, nos diversos tipos de tumores e de indivíduos. Esse fato, acreditamos, explica a ausência de expressão dos genes aqui estudados. **CONCLUSÃO:** Não houve expressão dos antídotos analisados.

**Palavras Chave:** Nódulo da Glândula Tireóide, Neoplasias da Glândula Tireóide, Marcadores Biológicos de Tumor, Imuno-histoquímica.

## **ABSTRACT**

---

---

---

MELO, D.H. **Tumor-specific antigenic peptides encoded by genes in benign and malignant thyroid tumors: an immunohistochemical analysis.** 106 f. (Dissertation) – Medical School, Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2008.

**INTRODUCTION:** A subset of thyroid tumors characterized by a follicular growth pattern can represent a serious challenge for diagnosis because the histologic features and diagnostic criteria used for distinguishing among these conditions can often be subtle and subjective. Immunohistochemistry and molecular pathology for genetic profiling have been utilized in an attempt to resolve some of these issues but have not yet succeeded in attaining a level of reliability or practicality that could be translated into the routine practice of surgical pathology. MAGE gene family encodes tumor-specific antigens that are recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes. In cancers, these genes are re-activated and their encoding proteins are frequently expressed in various histological types of cancers. There is, however, little information on their expression in thyroid tumors. This study was proposed to verify the expression of the MAGE-A4 and MAGE-C1 antigens in human thyroid tumors, and to explore the potential implications regarding diagnosis and therapy using MAGE peptides. **MATERIALS AND METHODS:** It was performed a retrospective case-control study involving 70 patients who underwent surgical therapy at the Ribeirao Preto Medical School Hospital, between January 1991 and December 2005. According to the histological type of thyroid neoplasm, 70 patients in our study were divided into four groups: 20 adenomatous goiter, 10 follicular adenoma, 24 papillary carcinoma, 16 follicular carcinoma. Inclusion criteria were: clinical data and optimum histological preparation available. All data including age, gender, localization, size of tumor, lymphatic infiltration and outcome were obtained from the clinical-pathologic records. The search of immunohistochemical analysis with MAGE-A4 and MAGE-C1 antibodies was done. **RESULTS:** Among the patients with benign pathologies, the ratio between female versus male were 9:1; the mean age was 42,9 years with standard deviation of 9,88 years and the median was 43 years. On the clinical evaluation we can observe that the nodule size considering the major diameter had mean of  $3,0 \pm 1,53$  cm (1 to 8 cm). Twenty one cases had tumors on the right lobe and nine cases on the left lobe of the thyroid gland. The ratio between the left and right lobe for the follicular adenoma was 6:1. Considering the malignant disease distribution by the sex, we observed that 85% of the patients were female, with a ratio between male and female of 8,5:1,5. The mean of age was 48,45 years with standard deviation of 17,0 years and the median was 48 years. On the clinical evaluation we can observe that the nodule size considering the major diameter had mean of  $3,63 \pm 1,73$  cm (0,6 to 8 cm). Tumor localization was predominantly in the right lobe in follicular carcinoma (the ratio between the right and left lobe was 1,5:1) and predominantly in the left lobe in papillary carcinoma (the ratio between the left and right lobe was 1,67:1). Lymphatic infiltration was observed in 37.5% in follicular carcinoma and 50% in papillary carcinoma. Among the antigens examined, MAGE-A4 and MAGE-C1, were not expressed in any of the tissues. **CONCLUSION:** The malignant degeneration of normal tissues is a multifactorial process in which both genetic host and environmental elements

contribute to produce cancer, and vary considerably both among tumor types and among individual patients. We believe that this fact explains the absence of immunohistochemical expression of antigens studied here.

**Key words:** Thyroid Nodule, Thyroid Neoplasms, Biological Tumor Markers, Immunohistochemistry.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>30</b>
2.1. Epidemiologia .....	31
2.2. Abordagem do nódulo tireóideo .....	32
2.3. Comportamento biológico das doenças foliculares .....	38
2.4. Expressão de moléculas em doenças tireóideas .....	40
2.5. Antígenos CTA (antígenos tumorais específicos) .....	45
2.6. Os antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 .....	47
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
4.1. Seleção dos casos e revisão histológica .....	52
4.2. Exame imuno-histoquímico .....	54
4.3. Análise das reações.....	56
4.4. Aquisição das fotomicrografias .....	57
4.5. Análise estatística .....	57
4.6. Ética .....	57
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
6.1. Diagnóstico das doenças tireóideas.....	69
6.2. Mecanismos de ação dos CTAs.....	74
6.3. Características biológicas dos CTAs.....	79
6.4. A ausência de expressão.....	81
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>88</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>105</b>

## **ANEXO DE PUBLICAÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

---

Os primeiros relatos da presença de aumento do volume tireóideo datam do século V a.c., através de escritos chineses, seguidos pelos escritos egípcios do século II a.c. Na idade média, esculturas incas retratavam a presença de bócio entre as mulheres e no século XVIII, casos foram identificados na América do Sul por Alexander Von Humboldt. No Brasil, os primeiros relatos datam do século XIX, feitos por Auguste de Saint-Hilaire e colaboradores (MEDEIROS-NETO, 1977; FERRAZ; BRANDÃO, 1989).

Esses aumentos de volumes são decorrentes de diferentes doenças que afetam a glândula tireóide devido a alterações morfológicas, funcionais e auto-imunes. Entre as doenças endócrinas, as de tireóide constituem a segunda causa mais freqüente, sendo superadas somente pelo diabetes.

Excluídas as neoplasias e as tireoidites, todo aumento do volume tireóideo é considerado bócio. Os oncologistas não aceitam essa definição, pois na eventualidade do aumento de volume ser decorrente de neoplasia, seu diagnóstico pode ser retardado. O aumento do volume, muitas vezes acontece sob a forma de nódulos tireóideos que são as alterações mais freqüentes, decorrentes de: manifestações benignas (nódulos colóides, cistos simples ou tireoidites), responsáveis por 80% dos casos das doenças da tireóide; de adenomas foliculares encontrados em 10 a 15% e de cânceres de tireóide, em torno de 5% (SINGER *et al*, 1996). O diagnóstico diferencial entre essas doenças é difícil, principalmente quando se considera somente o aspecto clínico.



De fato, o nódulo tireóideo solitário é a alteração mais evidente na prática clínica entre pacientes com aumento do volume tireóideo. Geralmente, consiste em um nódulo dominante, palpável, como parte de um bócio multinodular. Do ponto de vista prático, a abordagem de um nódulo solitário é a mesma de um nódulo aparentemente dominante (HEGEDUS, 2004). Causas benignas menos comuns são: fibromas, tumores hialinizantes e cistos dermóides intratireóideos (HEGEDUS *et al*, 2003).

O câncer de tireóide foi primeiro descrito pelo cirurgião americano William Halsted, a partir de ampla experiência com tireoidectomias, quando o denominou de degeneração sarcomatosa. O carcinoma da glândula tireóide é um tipo de câncer de incidência considerável, correspondendo a 1% de todas as neoplasias malignas do corpo humano, sendo a doença maligna mais freqüente do sistema endócrino (DUMONT *et al*, 1992). São estimados entre 13.000 e 20.000 novos casos de câncer de tireóide por ano, que promovem cerca de 1.100 a 1.300 mortes anualmente nos Estados Unidos (DeGROOT *et al*, 1990). No Brasil, a incidência varia de 0,7 a 3,0 casos em 100.000 habitantes, conforme a região, e a mortalidade vem apresentando queda de 0,28 para 0,22 em 100.000 homens e 0,51 a 0,42 em 100.000 mulheres (COELI *et al*, 2005).

O tipo mais comum de câncer de tireóide é chamado de carcinoma bem diferenciado. Os carcinomas papilífero e folicular fazem parte desse grupo de lesões, perfazendo aproximadamente 79% e 13%, respectivamente, entre todos os casos de câncer de tireóide (HEGEDUS *et al*, 2004). Essas lesões se originam de células foliculares, têm prognóstico e comportamento clínico

diferentes, porém são controláveis quando bem tratadas. Compartilham de grupo de cânceres com prognóstico relativamente favorável, pois a sobrevida em 10 anos é de 90% a 95% para o carcinoma papilífero e 80% a 85% para o folicular (MAZZAFERRI; YONG, 1981; EMERICK *et al*, 1993; SHAHA; LOREE; SHAH, 1995). Os carcinomas medular (bem diferenciado) e anaplásico (indiferenciado) são menos freqüentes, porém mais agressivos, metastatizando-se precocemente e com prognóstico reservado. As células C parafoliculares da glândula tireóide dão origem ao carcinoma medular, que são responsáveis por, aproximadamente, 3% a 5% de todas as lesões malignas tireóideas (HUNDAHL *et al*, 1998). Essa lesão tem prognóstico menos favorável do que os carcinomas papilífero e folicular, pois a sobrevida em 10 anos é de aproximadamente 65% a 80% (DUH *et al*, 1989). O carcinoma anaplásico ou indiferenciado representa aproximadamente 2% a 5% dos cânceres de tireóide e se caracteriza por doença avançada quando do diagnóstico e, por isso, cursa com prognóstico ruim (HUNDAHL *et al*, 1998; VENKATESH *et al*, 1990). O linfoma primário da tireóide representa aproximadamente 5% a 7% de todos os cânceres da tireóide (HAMBURGER; MILLER; KINI, 1983) e se associa com sobrevida em cinco anos de aproximadamente 50% (RASBACH *et al*, 1985).

Tipicamente, os tumores de tireóide apresentam-se como nódulo único e indolor em paciente eutireóideos. As mulheres são afetadas mais freqüentemente do que os homens, sendo a maioria dos casos registrada entre a 3ª e 7ª décadas. O prognóstico é melhor para pacientes abaixo dos 40 anos, sem extensão tumoral extracapsular ou invasão vascular (GRANT *et al*, 1988;

SANDERS; CADY, 1998). A idade parece ser o mais importante fator prognóstico independente (MAZZAFERRI, 1991).

A importância de estudar os nódulos encontra-se apoiada na necessidade de excluir o câncer de tireóide, presente em até 10% dos achados, dependendo da idade, sexo, exposição à radiação, história familiar e ingestão de iodo (SINGER *et al*, 1996). Além disso, procura-se evitar intervenção cirúrgica desnecessária para nódulos benignos, embora a doença multinodular tenha os mesmos riscos de malignidade que os nódulos solitários (MARQUSEE *et al*, 2000). Assim, é fundamental que se faça a distinção entre lesões benignas e malignas e, se possível, que se estabeleça o grau de malignidade do tumor antes do ato cirúrgico. Nesse sentido, tentativas têm sido feitas para que, através da PAAF (punção aspirativa com agulha fina), essas informações sejam obtidas (RUSCHENBURG *et al*, 1999). O material coletado pela PAAF permite a realização de imuno-histoquímica, colorações especiais e estudos biomoleculares, porém muitas vezes as informações são inconclusivas (RUSCHENBURG *et al*, 1999). Por isso, necessária se faz a procura por novas técnicas que favoreçam essa identificação.

As lesões mais freqüentemente encontradas na glândula tireóide pelos patologistas são originadas das células foliculares. As células foliculares da glândula tireóide crescem e se multiplicam de maneira não uniforme, provavelmente, devido à carga genética de alguns clones foliculares influenciados por estímulos fraco ou moderado promovidos por TSH (hormônio tireoestimulante), dietas (deficiência de iodo), má nutrição, poluição, fatores hereditários, exposição à radiação ionizante, envelhecimento, anticorpos e

peptídeos estimulantes do crescimento - IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina), TGI, EGF (fator de crescimento da epiderme), TGF (fator de crescimento do trofoblasto), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), e as citocinas (DUMONT *et al*, 1992; BROWN, 1995). O aspecto policlonal das células foliculares gerado, apesar da origem monoclonal, determina propriedades metabólicas diferentes dentro do mesmo folículo, gerando diferentes lesões (DUMONT *et al*, 1992; BROWN, 1995). A maioria dessas lesões pode ser dividida em benignas e malignas, baseadas nas características nucleares e/ou invasivas (ROSAI; CARCANGIU; DeLELLIS, 1992; BALOCH; LIVOLSI, 2002;).

O estudo científico do câncer humano está em fase sem precedente, em que os elementos genéticos e moleculares alterados estão sendo determinados. Essas descobertas têm sido possíveis graças à recente evolução nas técnicas de genética molecular, que têm permitido a identificação de alterações do DNA e das proteínas, presentes nos tumores. Sabe-se que os tumores resultam de uma série de passos genéticos que envolvem alterações de vários genes, alterações essas desencadeadas por carcinógenos. Atualmente, essas alterações, com interpretação e aplicabilidade, ainda não atingiram amplo domínio. A compreensão desses fundamentos da biologia molecular torna-se útil, pois poderão permitir a visão da doença, etiologia e, principalmente, da terapêutica do câncer.

Um grupo de peptídeos antigênicos de tumores apresentados por moléculas HLA classe I e reconhecidos por linfócitos T citotóxicos são os produtos das famílias de genes MAGE (“melanoma antígeno”), BAGE (“B

melanoma antigen”), GAGE (“G melanoma antigen”) e LAGE (“L-recognized melanoma antigen”)/NY-ESO-1 (“New York oesophageal squamous cell carcinoma 1”). Entre tecidos normais, esses genes são expressos apenas em células que não apresentam os genes HLA e, portanto, não podem apresentar os peptídeos para uma resposta T citotóxica (GAUGLER *et al*, 1994; De PLAEN *et al*, 1994).

Em cânceres, esses genes são ativados e as proteínas codificadas são expressas em vários tipos histológicos (GAUGLER *et al*, 1994). Como esses antígenos estão presentes, eles podem expressar moléculas HLA classe I, funcionando como antígenos específicos e servindo de base para fazer uso de terapêutica imunoterápica. Assim, os genes MAGE são ativados nas espermatogonias, inativados em células somáticas e expressos, quase exclusivamente, em tecidos com câncer (De PLAEN *et al*, 1994; GAUGLER *et al*, 1994).

Em estudo recente, Figueiredo *et al* (2006), analisando antígenos tumorais específicos (MAGE-1, -4, -10, -12, BAGE, GAGE, LAGE, NYESO-1 e PRAME (“Preferentially Expressed Antigen of Melanoma”)) verificaram que esses são expressos em proporções variáveis (6,1 a 48,5%) em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, e que em 66,6% dos casos ocorreu a expressão de, pelo menos, um desses antígenos e essa expressão se correlacionou com tumores avançados. Esses resultados nos motivaram a continuar este estudo, procurando por expressões desses antígenos em diferentes sítios de tumores da cabeça e pescoço. Como a técnica da imunohistoquímica tem maiores vantagens sobre a RT-PCR (“Reverse Transcription-

Polymerase Chain Reaction”), passamos a utilizá-la.

Ruschenburg *et al* (1999) demonstraram a utilidade da expressão dos genes MAGE-A1 e GAGE-1/-2 detectados na PAAF através de RT-PCR, como informação adicional para condução do carcinoma papilífero da tireóide. Maio *et al* (2003) avaliaram a expressão de CTAs em carcinoma medular esporádico da tireóide e observaram que o NY-ESO-1 foi expresso em 54,5% dos casos e foi significativamente correlacionado à recidiva tumoral. Milkovic; Sarcevic e Glavan (2006) observaram que quanto maior o tumor, menor a expressão do MAGE-A3 nos carcinomas papilíferos. Esses autores concluíram que seus achados indicam possível participação dos genes nas etapas da carcinogênese tireóidea, sendo, pois, de utilidade no diagnóstico histopatológico e na antecipação dos passos da história natural da doença. Groeper *et al* (2007) demonstraram a imonumarcção de MAGE-A4 relacionada às moléculas HLA-A2 em câncer de pulmão. Portanto, baseados nessas informações, é esperada a expressão de MAGE-A4 em todos os grupos analisados em nosso estudo.

A expressão de um marcador poderá: identificar a pessoa que tem e a que terá câncer; detectar as presenças de remanescentes de neoplasia nas margens cirúrgicas e de metástase linfonodal; estabelecer a agressividade do câncer; identificar neoplasias indiferenciadas, além de indicar o tratamento a ser realizado. Porém, esse marcador ideal para lesões de tireóide, ainda não está determinado.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2.1. Epidemiologia

O bócio pode ser classificado, com bases anatômicas, em difuso ou nodular. O bócio nodular é bastante prevalente, sendo uma alteração palpável encontrada em 4 a 7% da população norte-americana adulta (Singer *et al*, 1996). Os nódulos tireóideos, geralmente são a representação do bócio, sendo achados comuns na clínica diária. O nódulo solitário é encontrado em 1,5% dos homens e 6,4% das mulheres, dependendo do estudo (MAZZAFERRI, 1993; BURCH, 1995). Por outro lado, fazendo uso da ultrasonografia (USG), a prevalência de nódulos não palpáveis passa a ser de 20 a 70% em estudos clínicos e se o estudo for com material de autópsia, sua presença chega a 50% (TAN; GHARIB, 1997). É uma doença predominante entre as mulheres, mais freqüente em idades avançadas, chegando a superar 50% de incidência a partir dos sessenta anos de idade (SINGER *et al*, 1996). Dados nacionais apresentados por Tomimori *et al* (1995) mostram a incidência de 56% de alterações ultra-sonográficas na tireóide em mulheres adultas, dos quais, 17% são decorrentes da doença nodular.

Entre as doenças malignas do sistema endócrino, o câncer da tireóide é o mais freqüente, representando 90% de todos os cânceres endócrinos (HUNDAHL *et al*, 1998; GREBE; HAY, 1997). Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas e seu índice varia substancialmente entre as diversas regiões do mundo (SHAHA; SHAH; LOREE, 1998). O câncer de tireóide é três vezes mais freqüente nas mulheres, principalmente na faixa etária dos 25 aos



65 anos. Segundo dados do Ministério da Saúde, no ano de 1993, o câncer de tireóide era responsável por 2,5% dos tumores malignos nas mulheres e 0,6% nos homens, corresponde a 1,3% de todos os casos de câncer matriculados no INCA de 1994 a 1998 e a 6,4% de todos os cânceres da cabeça e pescoço. Portanto, sua incidência é considerável na prática oncológica nacional (Dos SANTOS, 2005). Coeli *et al* (2005) apontam para um perfil de incidência e mortalidade do câncer de tireóide no Brasil compatível com o descrito na literatura mundial.

## **2.2. Abordagem do nódulo tireóideo**

A avaliação do nódulo tireóideo é realizada, na maioria dos pacientes, quando maiores do que 1cm, utilizando métodos diagnósticos invasivos, devido ao risco em abrigar tumores malignos (COOPER *et al*, 2006). Nódulos menores que 1cm podem ser encontrados em pacientes com risco elevado para neoplasia, embora o risco desses serem malignos seja o mesmo daqueles nódulos clinicamente palpáveis (HAGAG; STRAUSS; WEISS, 1998).

Além dos dados da história clínica e do exame físico, a abordagem inicial é realizada através de testes laboratoriais com dosagem dos níveis de TSH e T4 livre, para avaliar a função tireóidea e identificar a presença de hipo ou hipertireoidismo. Antes da década de 50, a avaliação funcional da glândula tireóide era feita através do reflexo Aquileo e dos efeitos metabólicos dos hormônios, como: variação do consumo de oxigênio, dosagem de colesterol e outros ainda menos específicos. Ganhou especificidade, numa certa época, a medida do iodeto ligado à proteína que, por ser muito limitada, cedeu lugar à

dosagem de triiodotironina (T3) e de tiroxina (T4) por método de saturação competitiva. Posteriormente, por meio da obtenção de anticorpos específicos, a avaliação passou a ser realizada pelo método de radioimunoensaio (RIE), que possibilitava, inclusive, a determinação das frações livres (NICOLAU, 2001; BENSEÑOR, 2002).

Por sua vez, o hormônio estimulador da tireóide (TSH), pelo seu efeito trófico sobre a glândula tireóide, mereceu destaque na década de 80 devido à sua importância no diagnóstico do hipotireoidismo. A maior sensibilidade na determinação sérica foi pelo método de RIE, porém, essa técnica não se mostrou tão eficaz para os quadros de tireotoxicose, permitindo difundir, então, a técnica em que se usa o teste de estímulo com o hormônio hipotalâmico liberador de TSH (TRH). No final da década de 80, as técnicas de segunda geração determinavam níveis de TSH com sensibilidade de 0,1mU/L. Atualmente, as técnicas de terceira geração alcançam sensibilidade de 0,01mU/L, permitindo o diagnóstico de hipertireoidismo subclínico e também melhorar o controle das terapias supressivas (NICOLAU, 2001; BENSEÑOR, 2002). Segundo Bianco; Marone e Correa. (1988), esse método praticamente substituiu o teste com TRH.

Bartalena; Bogazzi e Pinchera (1991) consagram o TSH e a tiroxina livre (T4 Livre) como exames suficientes para definir o estado funcional tireóideo. Aliados aos TSH e T4 livre, Dayan e Daniels (1996) consideram importante a dosagem sérica de títulos de anticorpos antitireóideos, antiperoxidase e antitireoglobulina no auxílio ao diagnóstico das doenças auto-imunes ou neoplasias da glândula, passando a fazer parte do rol de exames laboratoriais

da avaliação tireóidea.

Os estudos de imagem têm revolucionado a avaliação das doenças da tireóide nas três últimas décadas. Entretanto, é preciso ter em mente que, apesar do uso freqüente da tecnologia, os estudos, em geral, não são baseados em evidências e existem poucos estudos avaliando a relação custo-benefício na utilização dos procedimentos de imagem (ORTIZ *et al*, 1998).

As avaliações clínicas e laboratoriais são fundamentais na abordagem das doenças tireóideas, porém, há uma ampla variação na interpretação desses achados, principalmente em relação à palpação da glândula tireóide (JARLØV *et al*, 1998). Portanto, não há dúvida sobre a importância do uso dessa tecnologia apesar de, na maioria dos casos, não ser possível distinguir entre lesões benignas e malignas, tendo, pois, sua importância clínica limitada (ORTIZ *et al*, 1998; JENNINGS, 1996). Entretanto, em recente levantamento da “European Thyroid Association”, 88% dos médicos entrevistados disseram fazer uso do estudo de imagem em pacientes eutireóideos com nódulo solitário e sem suspeita clínica de carcinoma (BENNEDBAEK; PERRILD; HEGEDÜS 1999). Por outro lado, os endocrinologistas americanos atribuem menor importância a essa tecnologia, considerando-a supérflua para a maioria dos pacientes (ORTIZ *et al*, 1998; JENNINGS, 1996).

A cintilografia, outrora utilizada como ferramenta importante na avaliação do nódulo tireóideo, tem assumido um papel secundário atualmente. A medida da captação de iodo radioativo pela tireóide foi introduzida no final da década de 1930, sendo usado como teste inicial da função tireóidea por muito tempo, porém, tem sido, nos últimos anos, substituída por testes *in vitro*, mais

sensíveis e específicos (MCDOUGALL; CAVALIERI, 2000). Em uma revisão de 4457 pacientes com nódulos tireóideos submetidos à cintilografia seguida pela intervenção cirúrgica, Ashcraft e van Herle (1981) revelaram que a prevalência de nódulos frio, morno e quente era de 84%, 10% e 5,5%, respectivamente. Segundo esses autores, eram malignos 16% dos nódulos frios, 10% dos mornos e 4% dos quentes (ASHCRAFT; van HERLE, 1981). A maioria das cintilografias é realizada com Iodo ou Tecnésio, embora outros isótopos estejam sendo testados. Atualmente, a cintilografia tem seu emprego limitado ao pacientes com evidências de hipertireoidismo, como auxiliar no estudo da PAAF e na pesquisa de remanescentes tireóideos, após intervenções cirúrgicas para erradicação do câncer tireóideo (ASHCRAFT; van HERLE, 1981).

A USG, associada aos dados dos exames físico e laboratorial, contribui na avaliação dos nódulos tireóideos. Embora seja um exame operador-dependente, a USG moderna é segura, proporciona imagens claras, tem boa resolução e é amplamente disponível no território brasileiro (BUTCH; SIMEONE; MUELLER, 1985; LEOPOLD, 1980). Associado às técnicas de estudo Doppler, tornou-se um dos mais importantes instrumentos de investigação morfológica da tireóide, refletindo sua permanente evolução e aplicabilidade (NAIK; BURY, 1998; KERR, 2001). A USG trouxe maior facilidade na determinação das dimensões glandulares, sendo mais confiável que a palpação, mesmo quando realizada por profissionais inexperientes (NAIK; BURY, 1998; KERR, 2001; PETERSON *et al*, 2000). A USG é também útil na diferenciação entre lesões císticas e sólidas, além de determinar a

localização exata e o tamanho de nódulos palpáveis e não palpáveis (incidentalomas) (PETERSON *et al*, 2000). Além disso, fornece características relacionadas à malignidade, como: homogeneidade, hipoeogenicidade, microcalcificações, irregularidade, hipervascularização central e ausência de “halo” ao Doppler. Permite também identificar linfonodos cervicais suspeitos (SIMEONE *et al*, 1987). A especificidade da USG é de 88,7% na avaliação pré-operatória de neoplasias foliculares e 92,3% para as não foliculares (CAPPELLI *et al*, 2006). Uma das limitações da USG ocorre quando se avaliam tumores volumosos e/ou mergulhantes.

A glândula tireóide pode ser avaliada também por outras técnicas de imagem, como a radiografia simples, a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética. Cada uma delas com suas vantagens e limitações, mas sem indicações clínicas absolutas para realização na maioria dos pacientes (HOPKINS; READING 1995, LOEVNER, 1996). A principal limitação das técnicas mencionadas, além dos custos, é a baixa especificidade para o parênquima tireóideo. Outro moderno exame de imagem para avaliação do nódulo tireóideo é a tomografia computadorizada com emissão de pósitron, ainda em fase experimental, mas com resultados promissores (de GEUS-OEI *et al*, 2006).

Considerando que cada vez mais aparelhos de USG são disponibilizados, maior quantidade de lesões menores de 1cm será diagnosticada (DAVIES; WELCH, 2006). Deve-se frisar que a maioria desses microcarcinomas papilíferos de tireóide tem excelente prognóstico (ROTI *et al*, 2006), reforçando a importância no diagnóstico precoce. Além do estudo

anatômico da glândula tireóide, a USG é também adequada para auxiliar na realização da PAAF e melhorar sua sensibilidade permitindo a retirada de material em pontos suspeitos.

O uso da punção na avaliação do nódulo tireóideo foi introduzida década de trinta, ao fazer uso de agulha calibrosa para obter amostras de tecidos para estudo histológico. Posteriormente, outros autores utilizaram a técnica para colheita de espécimes com o mesmo objetivo (KAPLAN, 2000). Atualmente, a maioria dos centros pratica a técnica utilizando agulhas de menor calibre, que geram amostras menores, porém suficientes para serem avaliadas a partir de critérios citológicos. O mérito da introdução da PAAF como ferramenta diagnóstica é atribuída aos patologistas europeus, através de pesquisas realizadas entre 1952 e 1977 (KAPLAN, 2000). Ao longo da década de 1980, as opiniões se dividiram entre os especialistas americanos, sobre a importância da PAAF, até que em 1981, Ashcraft e van Herle, fazendo revisão sobre as técnicas diagnósticas pré-operatórias para os nódulos tireóideos, concluíram ser essa a melhor alternativa dentre as disponíveis. Mas, o ceticismo ainda continuou por algum tempo entre os americanos (BLUM, 1984; HAJDU; MELAMED, 1984). Desde então, a PAAF tem conquistado, progressivamente, maior aceitação (ANDERSON; WEBB, 1987; ASP *et al*, 1987), incluindo o apoio da “American Thyroid Association” (SINGER *et al*, 1996), da “American Association of Clinical Endocrinologists” (FELD *et al*, 2006), e seu emprego tornou-se generalizado devido às vantagens apresentadas e confirmadas.

Atualmente, a PAAF é considerada como a ferramenta diagnóstica mais importante para os nódulos tireóideos, não só por necessitar de material

simples como seringa e agulha de calibre de 21 a 25, mas também por ser um método seguro, eficaz, de baixo custo, de fácil execução e bem tolerado pelo paciente. O material retirado permite a realização de imuno-histoquímica, colorações especiais e estudos biomoleculares, além de fornecer informações úteis no diagnóstico e planejamento da conduta. Quando poucas células estão presentes na amostra, o diagnóstico fica impossível e nova colheita torna-se necessária. A probabilidade em se obter diagnóstico com o uso da PAAF varia de acordo com a instituição, mas geralmente está em torno de 80% das amostras analisadas (SINGER *et al*, 1996). Dessas, 80% são benignas, 10 a 15% são suspeitas e 5% são cânceres. Punções indeterminadas podem estar associadas a falhas na técnica, pouca experiência do patologista, nódulos pequenos, lesões com componentes sólido e cístico e nódulos fibróticos.

Em mãos experientes, existem poucas complicações durante a realização da PAAF e essas podem ser: dor, hematoma, infecção e paralisia do nervo laríngeo recorrente. A disseminação de células tumorais pelo trajeto percorrido pela agulha durante o exame aconteceu em 0,14% dos casos, segundo os estudos de Ito *et al* (2005).

### **2.3. Comportamento biológico das doenças foliculares**

Os diferentes clones celulares da glândula tireóide crescem e se multiplicam de maneira não uniforme, pois sofrem a ação de estímulos ambientais e de peptídeos estimulantes do crescimento de maneira diferente (APEL *et al*, 1995; KROHN *et al*, 1998). O aspecto policlonal determina propriedades metabólicas diferentes e podem gerar diferentes lesões (APEL *et*

*al*, 1995; KROHN *et al*, 1998). Considera-se que a hiperplasia seja de origem policlonal, enquanto a neoplasia de proliferação monoclonal de células transformadas geneticamente. A análise de clones celulares tem sido utilizada na distinção entre hiperplasia e neoplasia (KOPP *et al*, 1994; APEL *et al*, 1995).

As doenças da tireóide são derivadas das células foliculares em 95% dos casos e, durante a progressão de adenomas até carcinomas, representam um modelo de transformação maligna (KONDO; EZZAT, 2006). Esse espectro de progressão encontra-se unido a um modelo de defeitos intragênicos cumulativos relacionados com diferenciação tumoral, agressividade e potencial metastático (KONDO; EZZAT, 2006).

O modelo proposto para carcinogênese tireóidea está baseado em conceitos gerais e vias específicas. O rearranjo de genes envolvendo RET proto-oncogene ou as mutações ao longo da via Ras/BRAF são os responsáveis pela maioria desses carcinomas (KONDO; EZZAT, 2006). Essas anormalidades intragênicas são consideradas eventos iniciais na carcinogênese da tireóide. O comportamento e a progressão são modificados pela desregulação dos fatores de crescimento e seus receptores. Assim, os fatores de risco, como a exposição à radiação, induzem à instabilidade genômica através de mecanismos diretos e indiretos, resultando em alterações genéticas envolvendo a via sinalizada pela Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (MAPK). A ativação oncogênica da MAPK aumenta a instabilidade genômica, conduzindo a alterações genéticas posteriores, envolvendo outras vias reguladoras do ciclo celular e moléculas de adesão. Esses eventos



promovem a progressão do carcinoma bem diferenciado para carcinoma pouco diferenciado (KONDO; EZZAT, 2006).

Baseadas nas observações clínicas, histológicas e moleculares, três vias diferentes são propostas para a proliferação neoplásica das células foliculares. Defeitos genéticos resultantes da ativação do RET ou BRAF são eventos precoces iniciais, relacionados com a exposição à radiação (KONDO; EZZAT, 2006). A baixa expressão do p27<sup>KIP1</sup>, que é inibidor da quinase e dependente da ciclina, e a forte expressão da ciclina D1 são importantes preditores de metástase linfática no carcinoma papilífero. A maioria dos carcinomas indiferenciados ou pouco diferenciados se origina dos carcinomas bem diferenciados através de eventos genéticos adicionais, incluindo o acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina e a inativação de p53 (KONDO; EZZAT, 2006).

#### **2.4. Expressão de moléculas em doenças tireóideas**

Os marcadores tumorais estão presentes em células tumorais e as diferenciam das células normais. As etapas evolutivas envolvidas na transformação das lesões pré-neoplásicas em neoplasias malignas, encontram-se representadas através de vias moleculares onde os seus componentes são potenciais marcadores tumorais. Os marcadores tumorais podem ser genes ou seus produtos expressos em células normais ou em células tumorais, nessas, de forma aberrante. As alterações genéticas que levam à produção de marcadores tumorais são: mutação pontual, amplificação gênica, rearranjo gênico e hiperexpressão (ASA, 2005; GURE *et al*, 2005).

Assim, os estudos consideram os marcadores envolvidos nos processos funcionais das células (SAVIN *et al*, 2006; FAGGIANO *et al*, 2007) e aqueles que promovem crescimento tumoral. Os marcadores tumorais encontram-se divididos em grupos, de acordo com o estágio da carcinogênese onde estejam envolvidos, ou seja, supressão tumoral, angiogênese, invasão tumoral, potencial metastático e resposta imune (GUMURDULU *et al*, 2003; JAKUBIAK-WIELGANOWICZ *et al*, 2003).

Alguns marcadores já foram analisados nas doenças da tireóide. A expressão de TPO (“thyroid peroxidase”) foi investigada em 215 pacientes com doenças neoplásicas e não neoplásicas da tireóide por Savin *et al* (2006). A sensibilidade de 89,9% para câncer e especificidade de 64,4% para lesões benignas obtidas não fornece segurança suficiente para o diagnóstico de lesões benignas e para diferenciá-las de malignas.

Kamoshida *et al* (2000) estudaram a expressão dos antígenos sangüíneos DU-PAN-2 (“pancreatic-cancer-associated antigen”), CA19–9 (“carbohydrate antigen 19-9”), Lewis<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>) e Lewis<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>) em 95 tumores de tireóide e verificaram que esses antígenos não se expressavam em tecido normal, mas sim em adenomas foliculares, onde sua expressão era de 7% e 21%, respectivamente. Entre os casos de carcinomas foliculares, a expressão do CA19–9 foi limitada a um caso (4%); negativa para DU-PAN-2 e fraca ou sem nenhuma expressão para Le<sup>a</sup> ou Le<sup>b</sup>. Em contraste, DU-PAN-2, CA19–9, Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup> foram expressos, respectivamente, em 98%, 84%, 33% e 49% dos 43 casos de carcinomas papilíferos.

As evidências da participação da COX-2 (ciclooxigenase-2) na tumorigênese através da promoção, da angiogênese, da estimulação do crescimento celular, da indução das metaloproteínas e da inibição da apoptose, conduziram Haynik e Prayson (2005) a observarem que a sua expressão era de 26% dos casos de carcinoma folicular e 29% dos casos de adenoma folicular com invasão capsular incompleta. Além disso, seus resultados demonstraram a existência de possível correlação entre a expressão da COX-2 com o aumento da recidiva tumoral.

A galectina-3 (GAL3) é membro de uma família de beta-galactosídeos ligados às lectinas animal. É encontrada amplamente nos tecidos humanos com distribuição diferente no interior da célula (restrita ao núcleo; no citoplasma e/ou na superfície celular), de acordo com o tipo e estado funcional. A GAL3 é produzida por macrófagos, células endoteliais e epiteliais (cólon, mama, rim) e encontra-se associada a várias condições fisiológicas e patológicas, inclusive nos processos envolvidos na carcinogênese (ORLANDI *et al*, 1998; BARTOLAZZI *et al*, 2001). Sua expressão é restrita às malignas de origem folicular nas quais as PAAF mostraram alta especificidade e sensibilidade na diferenciação de adenomas e carcinomas (ORLANDI *et al*, 1998). Um estudo multicêntrico conduzido, em 2001, pelo Dr A. Bartolazzi validou o papel da GAL3 no diagnóstico diferencial dos adenomas foliculares e carcinomas folicular e papilífero, com especificidade e sensibilidade superiores a 95% em espécimes cirúrgicos e citológicos (BARTOLAZZI *et al*, 2001).

Prasad *et al* (2005), avaliando a expressão de GAL3, fibronectina-1 (FN1), CITED1 ("CBP/p300-Interacting Transactivators with glutamic acid [E]

and aspartic acid [D]-rich C-terminal domain1”), citoqueratina 19 e HBME1 (“Hector Battifora Mesothelial cell”) em tecidos tireóideos neoplásicos e não neoplásicos detectaram significativa associação dos cinco marcadores com malignidade e elevada especificidade (>90%) quando comparados aos adenomas. Esses autores observaram que a expressão de GAL3, FN1 e HBME1, sozinhos ou em associação, era de 100% dos carcinomas e 24% dos adenomas. Quando utilizados em associação, contribuíram para o aumento da especificidade na determinação de doenças malignas em relação às benignas, de acordo com presença ou ausência dessas proteínas. Nas doenças não neoplásicas, as proteínas GAL3, CK19 e CITED1 foram expressas focalmente, em contraste com a expressão difusa encontrada nos carcinomas.

O marcador tumoral c-erbB-2 tem sido citado como importante fator prognóstico em vários tipos de tumores, mas o papel dessa oncoproteína nos tumores de tireóide ainda é controverso. Gumurdulu *et al* (2003) investigaram a sua expressão em diferentes tumores tireóideos de 68 pacientes e observaram coloração positiva em 58% dos adenomas foliculares, 50% dos carcinomas papilíferos, 40% dos carcinomas foliculares e 75% dos carcinomas medulares. Os casos de carcinoma anaplásico apresentaram coloração negativa.

Fatores de transcrição específico da tireóide (Pax8 - “paired-box-protein 8”, TTF-1 - “thyroid transcription factor-1” e TTF-2 - “thyroid transcription factor-2”) parecem ser decisivos na diferenciação e organogênese tireóidea a tal ponto que Nonaka *et al* (2007) determinaram a expressão desses marcadores em 94 casos de neoplasias tireóideas. Todos foram expressos em carcinomas papilíferos, adenomas e carcinomas foliculares e carcinomas

anaplásicos. O Pax8 esteve expresso em 79% dos carcinomas anaplásicos, enquanto o TTF-1 e o TTF-2 o foram em somente 18% e 7%, respectivamente. Os autores concluíram que o Pax8 mostrou-se útil para o diagnóstico de carcinoma anaplásico.

A colagenase tipo IV 72-kd, conhecida como metaloproteinase-2 (MMP-2) e a MMP-1 fazem parte de um grupo de endopeptidases que digerem a matriz intercelular e facilitam a invasão e metástase de células malignas (RAY; STETLER-STEVENSON, 1994). Patel *et al* (2002) verificaram que a expressão de MMP-1 foi significativa estatisticamente em carcinomas papilífero e folicular quando comparada com as lesões benignas, porém sem relação com invasão, metástase e recidiva. Já a expressão foi positiva para MMP-2 em todos os casos de carcinomas estudados por Campo *et al* (1992), bem como em 9/11 metástases, sugerindo também a relação com a agressividade do tumor. Entretanto, nos estudos de Patel *et al* (2002) e Campo *et al* (1992), a expressão foi positiva também em condições benignas que sofrem remodelamento ou reparo (inflamação).

Bosolo *et al* (1997) correlacionaram a expressão de *bcl-2* e p53 nos mecanismos de apoptose e de proliferação em carcinomas de tireóide e verificaram que os dados sugerem a relação inversa da expressão de *bcl-2* com a apoptose, enquanto a expressão de p53 está diretamente relacionada a esse evento celular no carcinoma papilífero. Porém, não houve correlação com o seguimento dos pacientes nos parâmetros estudados.

Outros marcadores com potencial para contribuir na precisão do diagnóstico e na terapêutica das lesões tireóideas são: fator de crescimento do

fibroblasto (FGF), fator de crescimento do hepatócito (FGH) e seu receptor *met*, CD44V6 e CD57, CD82, HMGI(Y), MUC1, CEACAM1 e o S100C; recentemente revisados por Asa (2005).

## **2.5. Antígenos CTA (antígenos tumorais específicos)**

Antígenos tumorais específicos (CTA) são predominantemente expressos em células testiculares normais, como também em diferentes tipos histológicos de cânceres (SCANLAN *et al*, 2002 e 2004; ZENDMAN *et al*, 2003; SIMPSON *et al*, 2005). No testículo, os CTAs são expressos exclusivamente em células da linhagem germinativa com marcante variação no padrão de expressão protéica, durante diferentes estágios do desenvolvimento do esperma. Da mesma forma, essa expressão heterogênea também é observada em tumores malignos (SCANLAN *et al*, 2002; ZENDMAN *et al*, 2003). A maioria dos CTAs não tem função biológica específica conhecida, mas seu envolvimento nas sinalização, transcrição, translação e recombinação cromossomial tem sido proposto (ZENDMAN *et al*, 2003; SIMPSON *et al*, 2005). Também tem sido proposta, que a expressão aberrante dos CTAs em tumores resume a programação gênica das células germinativas e está relacionada a algumas características do fenótipo neoplásico tais como: imortalidade, invasividade, evasão imune e capacidade metastática (OLD, 2001; Simpson *et al*, 2005).

Por causa do padrão de expressão específico nos tecidos neoplásicos, os antígenos tumorais específicos são considerados alvos ideais para imunoterapia (SCANLAN *et al*, 2002; BODEY, 2002). Esse benefício tem sido

observado em pacientes imunizados com MAGE-A e NY-ESO-1, com resultados animadores após a imunização (MARCHAND *et al*, 1999; JAGER *et al*, 2000; CHEN *et al*, 2004). Entretanto, como os CTA são expressos em um pequeno grupo de tumores humanos e em uma fração dos casos, a identificação de outros CTAs é decisivo para enriquecer os atuais protocolos de imunoterapia. Atualmente, encontram-se descritas 44 famílias distintas de CTAs e múltiplos membros em cada família, resultando em 89 cópias no total (SIMPSON *et al*, 2005). Demonstrou-se que dezenove CTAs são capazes de induzir resposta imune em humanos (tanto humoral e/ou celular) (PARMIGIANI *et al*, 2006).

Vários desses antígenos têm sido utilizados como ferramentas para isolar genes que codificam antígenos reconhecidos nos tumores, como acontece na família MAGE. Essa família inclui, pelo menos, 17 genes denominados de MAGE-1 a 12 (atualmente, MAGE-A1 a MAGE-A12), MAGE-B1 a B4 e MAGE-C1 (ou CT7) (De PLAEN *et al*, 1994; LUCAS, *et al*, 1998; LURQUIN *et al*, 1997).

Entre os trabalhos utilizando CTAs em doenças da tireóide, Ruschenburg *et al* (1999) demonstraram a utilidade da expressão dos genes MAGE-A1 e GAGE-1/-2, como informação adicional no diagnóstico do carcinoma papilífero da tireóide, eliminando as armadilhas da diferenciação citológica com bócioS adenomatosos. Na amostra analisada, 30% dos casos apresentaram expressão a pelo menos um dos antígenos. Maio *et al* (2003) avaliaram a expressão de CTAs em amostras de 23 pacientes com diagnóstico de carcinoma medular esporádico da tireóide e observaram que o NY-ESO-1

foi expresso em 54,5% dos casos. Milkovic; Sarcevic e Glavan (2006) observaram a expressão do MAGE-A3 em 60 pacientes com diferentes tipos histológicos de carcinoma de tireóide e detectaram maior frequência de reação intensa nos pacientes com infiltração linfática e relação inversa com o tamanho dos tumores.

## **2.6. Os antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1**

A família do gene MAGE (“melanoma antigen”) é expressa, quase exclusivamente, em tecidos com câncer (De PLAEN *et al*, 1994; GAUGLER *et al*, 1994), além de ser o sistema melhor estudado atualmente. Os genes MAGE são ativados nas espermatogonias, e inativados em células somáticas. Em cânceres, esses genes são ativados e as proteínas codificadas são expressas em vários tipos histológicos (GAUGLER *et al*, 1994). Como esses antígenos estão presentes, eles podem expressar moléculas HLA classe I, funcionando como antígenos específicos e servindo de base para o uso de terapêutica imunoterápica.

O gene MAGE-A4 apresenta dois alelos que codificam as proteínas MAGE-A4a e MAGE-A4b, essas diferindo em apenas um aminoácido (De PLAEN *et al*, 1994). O MAGE-A4 não é expresso somente em células germinativas masculinas, mas também na placenta onde não estão presentes moléculas HLA da classe I (GAUGLER *et al*, 1994). Além disso, a placenta produz enzimas supressoras da atividade das células T (MUNN *et al*, 1998). O MAGE-A4 é frequentemente expresso em carcinomas do esôfago (63%), do pulmão (51%), da bexiga (33%) e em melanomas metastáticos (28 %). Em



cabeça e pescoço ele foi identificado em 53 % dos casos por RT-PCR (DUFFOUR *et al*, 1999). Quando uma amostra de tumor mostra-se positiva para MAGE-A4, esse antígeno é geralmente expresso fortemente. Antígenos derivados do MAGE-A4 podem, assim, ser valiosos para imunoterapia contra o câncer. Por enquanto, tais antígenos ainda não foram identificados (DUFFOUR *et al*, 1999).

O MAGE-A4 tem sido estudado nos últimos anos e sua expressão tem sido detectada em melanomas (BRASSEUR *et al*, 1995; PRASAD *et al*, 2004; KAZAKOV *et al*, 2004) e em vários outros tumores (PEIKERT *et al*, 2006; BANDIĆ *et al*, 2006; MUEHLEISEN *et al*, 2007), mas há poucas citações em cânceres de tireóide.

O MAGE-C1 é outro membro da família MAGE de antígenos tumorais específicos. Ele também é conhecido como CT7 (CHEN *et al*, 1998) e está localizado em Xq26-Xq27 (LUCAS *et al*, 1998). O gene codifica uma suposta proteína de 1142 aminoácidos. Seu antígeno induz resposta imune somente humoral e é identificado no estudo imuno-histoquímico pelo anticorpo CT7-33. Em levantamentos da frequência da expressão do MAGE-C1 em vários tumores, foi observada sua presença, principalmente em melanoma cutâneo (46%), em cânceres de mama (15%) e de cólon (10%) (LUCAS *et al*, 1998). Em cabeça e pescoço expressou-se em 9,5% dos casos analisados por RT-PCR. Embora a maioria dos antígenos tumorais específicos da família MAGE tenha sido investigada em mieloma múltiplo e observada em 40% dos pacientes (van BAREN *et al*, 1999), a expressão do MAGE-C1 em mieloma não tem sido estabelecida. Para avaliar o gene CT7 como um alvo em potencial para imunoterapia do câncer, a análise de sua expressão antigênica em

diferentes tumores torna-se essencial (LIM *et al*, 2001). Testes imunohistoquímicos com MAGE-C1 (CT7-33), principalmente quando associados a outros CTAs, têm sido investigados com o objetivo de desenvolver vacinas contra o câncer.

### **3. OBJETIVOS**

---

---

O presente estudo em doenças foliculares benignas e malignas da glândula tireóide visa:

- Analisar a expressão imuno-histoquímica dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1;
- Avaliar as características diagnósticas e prognósticas relacionadas à imunomarcção dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **4.1. Seleção dos casos e revisão histológica**

A partir do arquivo do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), foram selecionados 207 casos de lesões tireóideas de origem no epitélio folicular, provenientes de tireoidectomias parciais ou totais.

Como critérios de inclusão foram necessários os seguintes dados clínicos e macroscópicos disponíveis: representação adequada da lesão, processamento histológico apropriado e disponibilidade de blocos de parafina em boas condições.

Foram excluídos os indivíduos cujos blocos de espécimes armazenados não possuíam área de tecido representativo das doenças estudadas e com prontuários incorretamente preenchidos.

Os critérios de inclusão específicos para as lesões foliculares da tireóide foram:

- Bócio colóide: presença de folículos grandes com colóide abundante variando em forma e tamanho. Ausência de cápsula bem formada, em maior aumento. As células de revestimento dos folículos com aspecto cubóide ou colunar baixa, niveladas e alinhadas em única camada.
- Adenoma folicular: as células de revestimento dos folículos com aspecto uniforme e semelhante às daquelas dos folículos normais. Presença de folículos pequenos e, geralmente, sem colóide. Algumas figuras de mitose e cápsula fibrosa íntegra característica, variando em

---

espessura. O parênquima adjacente comprimido. As invasões capsular e vascular estão ausentes.

- Carcinoma papilífero: presença de aumento e irregularidade nuclear, presença de corpos psamomatosos, núcleos claros ou em vidro fosco, fendas e pseudoinclusões nucleares.
- Carcinoma folicular: evidências de diferenciação de células foliculares, com ausência das características nucleares do carcinoma papilífero, porém são verificadas invasões capsular e vascular.

Para este estudo retrospectivo, de caso-controle, foram incluídos 70 casos operados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMRP-USP, no período de 1991 a 2005, sendo 20 bócios colóides, 10 adenomas foliculares, 16 carcinomas foliculares e 24 carcinomas papilíferos. Para o grupo-controle, selecionamos 10 casos de necrópsias com tecido tireóideo sem doenças.

As respectivas lâminas e blocos foram obtidas do arquivo do Departamento de Patologia do HCFMRP-USP e os casos foram revistos por dois observadores independentes. Em relação ao processamento tecidual, as peças cirúrgicas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por um período não superior a 48 horas, clivadas e obtidas áreas representativas da neoplasia, que foram então emblocadas em parafina para obtenção dos cortes histológicos de 4µm de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Os diagnósticos foram realizados segundo os critérios da classificação mais recente da Organização Mundial da Saúde para os tumores

tireóideos (DeLELLIS; WILLIAMS, 2004).

Os dados clínicos e macroscópicos disponíveis foram coletados (idade e sexo do paciente, tamanho do nódulo, multicentricidade, invasão vascular e capsular, extensão extraglandular, presença de metástases ganglionares e hematogênicas).

#### **4.2. Exame imuno-histoquímico**

Para cada caso foi selecionado um bloco representativo para a realização das reações imuno-histoquímicas, sendo obtidos cortes seriados de 4µm em lâminas com solução adesiva de 3-amino-propyltriethoxy-silano (Sigma Chemical Co. ®, St. Louis, MO/USA).

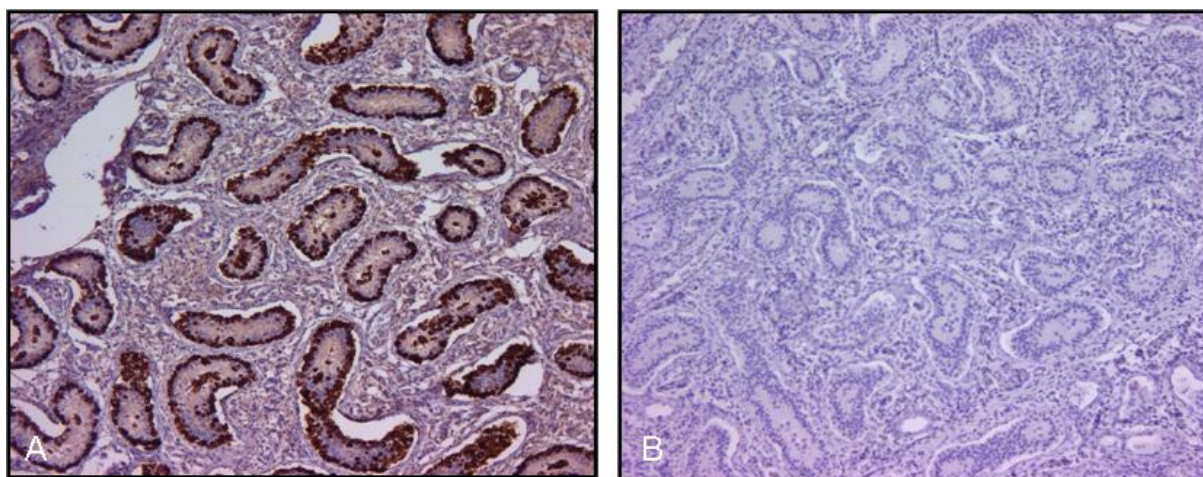
Os anticorpos utilizados para as reações imuno-histoquímicas foram: MAGE-A4 (57B, 1:4.000 em tampão EDTA 1mM, pH 8,0 - Ludwig Institute, NY) e MAGE-C1 (CT 7-33, 1:32.000, solução de ácido cítrico 10mM, pH 6,0 - Ludwig Institute, NY).

Para evitar reação endógena devido à presença de biotina e avidina, foram utilizados polímero dextran e sistema de amplificação enzimática NovoLink (Novocastra, UK). Resumidamente, cortes teciduais de 4µm foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor por 3 minutos em steamer, com solução de ácido cítrico 10mM/pH 6.0. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 6%. A incubação com o anticorpo primário foi feita a 37° C em câmara úmida a 4°C por 12 horas (“overnight”). A incubação com anticorpo secundário, diluído em PBS, foi realizada por 30 minutos a 37°C. Após lavagens em PBS, os cortes

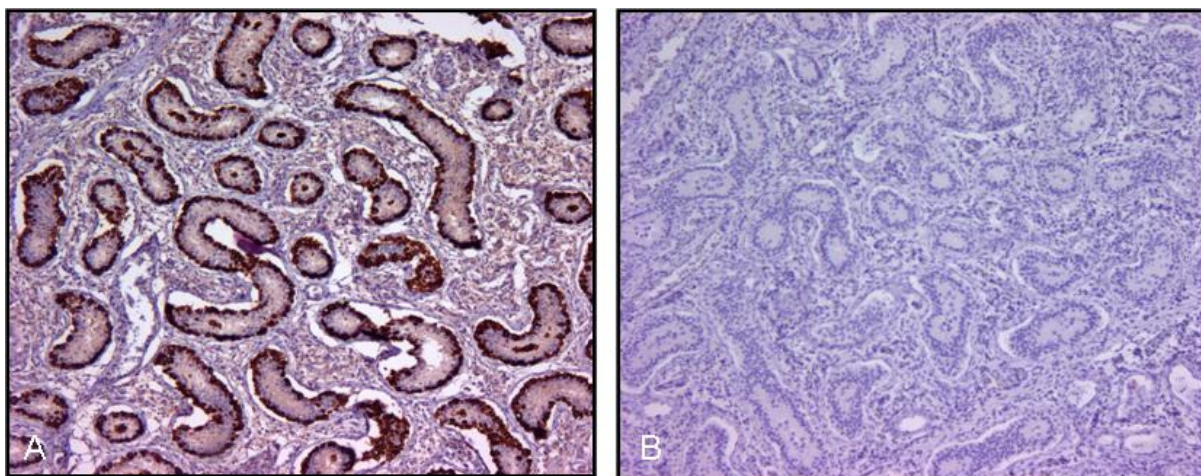


foram incubados por 30 minutos a 37°C com o sistema amplificador Novolink. Por fim, os cortes histológicos foram lavados em água corrente por 10 minutos, contracolorados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, novamente lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi realizada em resina Permount (Fisher Scientific®, Fair Lawn, NJ/USA, cód. S15-100).

Para cada bateria de reação foram utilizados controles positivos (testículo - no caso de CTA) como observados nas Figuras 1A e 2A. Os controles negativos foram estabelecidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por tampão PBS (“blank”), conforme demonstrado nas Figuras 1B e 2B.



**Figura 1.** Microfotografia de amostra de testículo com imunomarcção do antígeno MAGE-A4 pela expressão do anticorpo monoclonal 57B (100x). **(A)** Controle positivo. **(B)** Controle negativo.



**Figura 2.** Microfotografia de amostra de testículo com imunomarcção do antígeno MAGE-C1 pela expressão do anticorpo monoclonal CT7-33 (100x). **(A)** Controle positivo. **(B)** Controle negativo.

#### 4.3. Análise das reações

Foram realizadas em microscópio de múltipla observação, por dois observadores independentes, patologistas cirúrgicos com experiência na área, com desconhecimento da identidade dos casos e definidas mediante consenso. As reações foram classificadas subjetivamente quanto à extensão da imunomarcção em:

- **Zero:** até 5% das células neoplásicas marcadas.
- **1+:** 5 – 25% das células neoplásicas marcadas.
- **2+:** 25 – 50% das células neoplásicas marcadas.
- **3+:** 50 – 75% das células neoplásicas marcadas.
- **4+:** > 75% das células neoplásicas marcadas.

Para fins de análise estatística, não foram consideradas as intensidades das reações. Foi considerada imunomarcção positiva quando mais de 50%

das células neoplásicas foram marcadas (classificação 3+ e 4+).

#### **4.4. Aquisição das fotomicrografias**

Foi utilizado um sistema digital de aquisição de imagens da marca ZEISS composto de microscópio Axioskop 2 plus, câmera digital AxioCam HRc e o programa Axiovision 4.6.3. Para rodar o programa e guardar as imagens foi utilizado um computador Satélite® INT modelo Pentium 4 Intel®.

#### **4.5. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como valores médios (idade dos pacientes e tamanhos dos nódulos), porcentagem ou números absolutos. Tabelas de contingência foram elaboradas para testar a associação entre as variáveis qualitativas. O teste do Chi-quadrado (Pearson) foi utilizado na análise estatística dos resultados. Para as variáveis quantitativas (idade e diâmetro do nódulo) foi empregada a técnica de análise de variância (ANOVA - Analysis of Variance) para a comparação das médias. A estatística do teste foi a F-Fisher. Dois valores foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

#### **4.6. Ética**

O projeto de pesquisa foi devidamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Unidade de Pesquisas Clínicas do HCFMRP-USP (Processo n° 11.167/2007 - Anexo 1).

## **5. RESULTADOS**

---

Após levantamento de todos os pacientes com lesões foliculares da tireóide e aplicação dos critérios de inclusão, foram selecionados os 70 pacientes participantes do estudo, que após o processamento tecidual de seus blocos de parafina, revisão das lâminas, classificação histológica e aplicação dos exames imuno-histoquímicos, foram divididos em quatro grupos.

Nos grupos com doenças benignas foram observados os seguintes dados clínicos: idade, sexo, localização do nódulo, tamanho em centímetros observado à macroscopia, doença e expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 (Tabela 1).

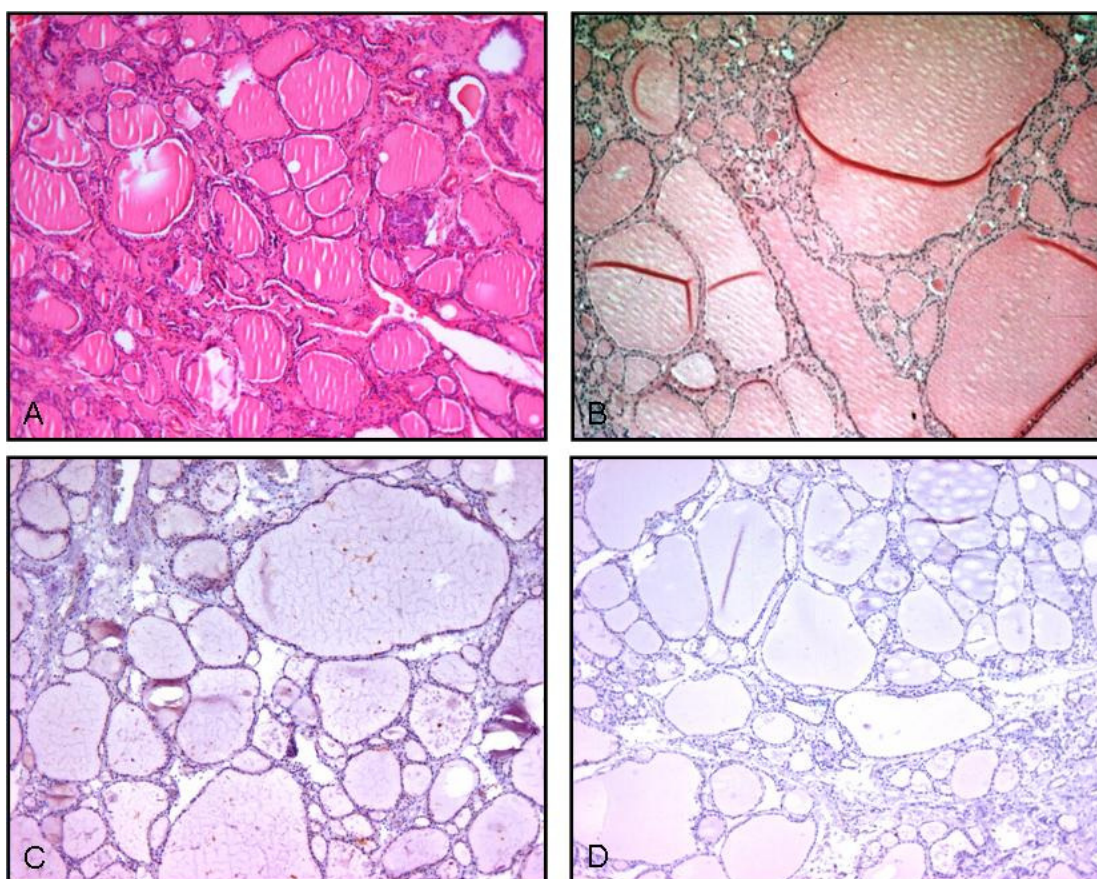
**Tabela 1.** Características demográficas, tumorais e sua relação com a expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 em doenças benignas.

Paciente	Idade	Sexo	Localização	Tamanho	Doença	MAGE-A4	MAGE-C1
1	18	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
2	39	F	Lobo D	1,0	Bócio	-	-
3	58	F	Lobo E	1,5	Adenoma	-	-
4	60	F	Lobo D	3,0	Bócio	-	-
5	29	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
6	43	F	Lobo D	1,0	Bócio	-	-
7	48	M	Lobo E	2,5	Bócio	-	-
8	32	F	Lobo E	1,0	Adenoma	-	-
9	51	F	Lobo D	2,0	Adenoma	-	-
10	45	F	Lobo D	4,0	Bócio	-	-
11	42	F	Lobo E	5,0	Bócio	-	-
12	46	F	Lobo D	3,0	Adenoma	-	-
13	53	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
14	28	F	Lobo E	4,0	Bócio	-	-
15	49	F	Lobo D	2,5	Bócio	-	-
16	25	F	Lobo E	4,0	Adenoma	-	-
17	56	M	Lobo D	3,0	Bócio	-	-
18	31	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
19	38	F	Lobo E	1,5	Adenoma	-	-
20	42	F	Lobo D	2,7	Bócio	-	-
21	36	F	Lobo D	8,0	Adenoma	-	-
22	55	F	Lobo D	5,0	Bócio	-	-
23	43	F	Lobo D	5,0	Bócio	-	-
24	51	F	Lobo D	3,5	Adenoma	-	-
25	42	F	Lobo E	3,0	Bócio	-	-
26	39	F	Lobo D	2,5	Adenoma	-	-
27	43	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
28	50	M	Lobo D	3,5	Bócio	-	-
29	36	F	Lobo E	3,0	Bócio	-	-
30	38	F	Lobo D	5,0	Adenoma	-	-

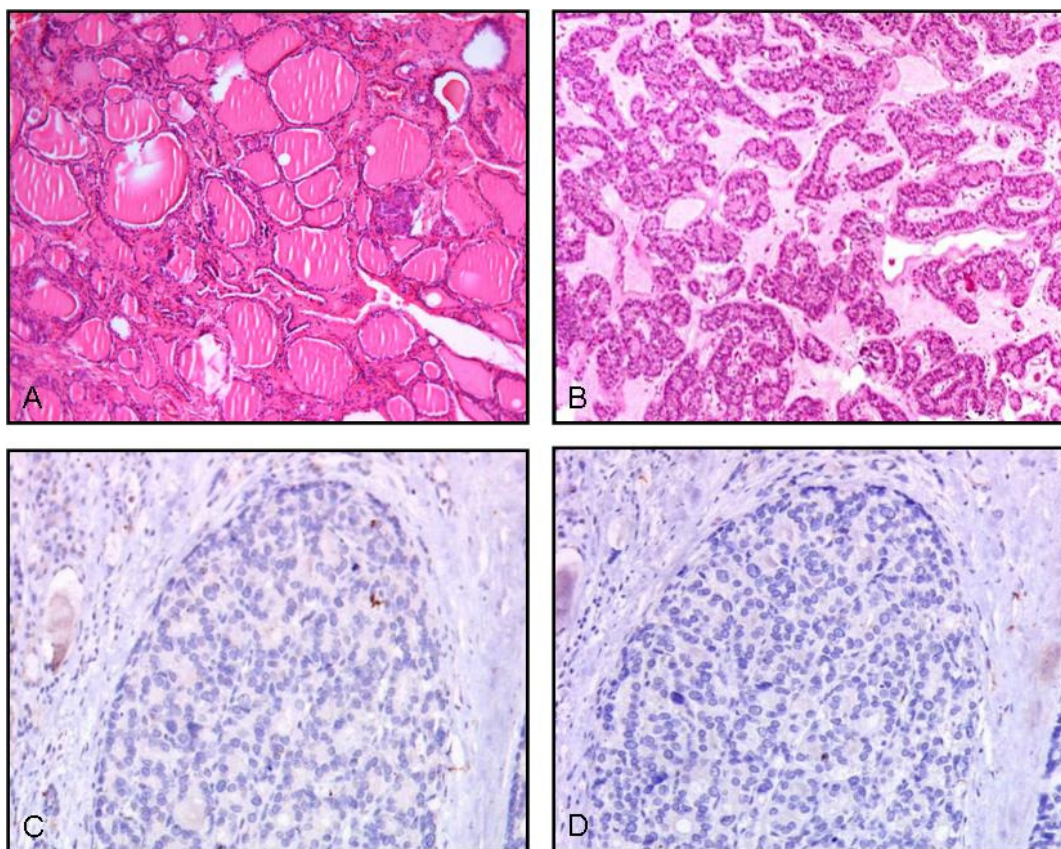
Conforme observado na Tabela 1, a distribuição, segundo o sexo, revelou que 90% dos pacientes com doenças foliculares benignas eram mulheres, com proporção entre mulheres e homens de 9:1. A média de idade nesse grupo foi de 42,9 anos com desvio padrão de 9,88 anos e mediana de 43 anos. Na avaliação clínica, podemos observar que o tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de  $3,0 \pm 1,53$  cm (1 a 8cm). Vinte e um casos tinham tumores localizados no lobo D da glândula tireóide e nove casos

no lobo E. Não foi detectada imunomarcacão em tecido tireóideo normal em nenhum grau de intensidade.

Da mesma forma, no grupo dos tumores benignos, não foi observada imunomarcacão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 de qualquer grau de intensidade em nenhuma das amostras. Na Figuras 3 e 4 são mostradas as reações de imunomarcacão em amostras de bócio colóide e adenoma folicular, respectivamente.



**Figura 3.** Microfotografia de amostras com imunomarcacão dos antígenos em bócio colóide. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de bócio colóide (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de bócio colóide com imunomarcacão negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de bócio colóide com imunomarcacão negativa para MAGE-C1 (100x).



**Figura 4.** Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em adenoma folicular. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de adenoma folicular (H&E 50x). **(C)** Microfotografia de amostra de adenoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de adenoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x).

Para os grupos com carcinoma papilífero e folicular foram observados parâmetros clínicos e patológicos: idade, sexo, localização, tamanho do tumor (cm) observado à macroscopia, doença, infiltração angiolinfática e expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 (Tabela 2).



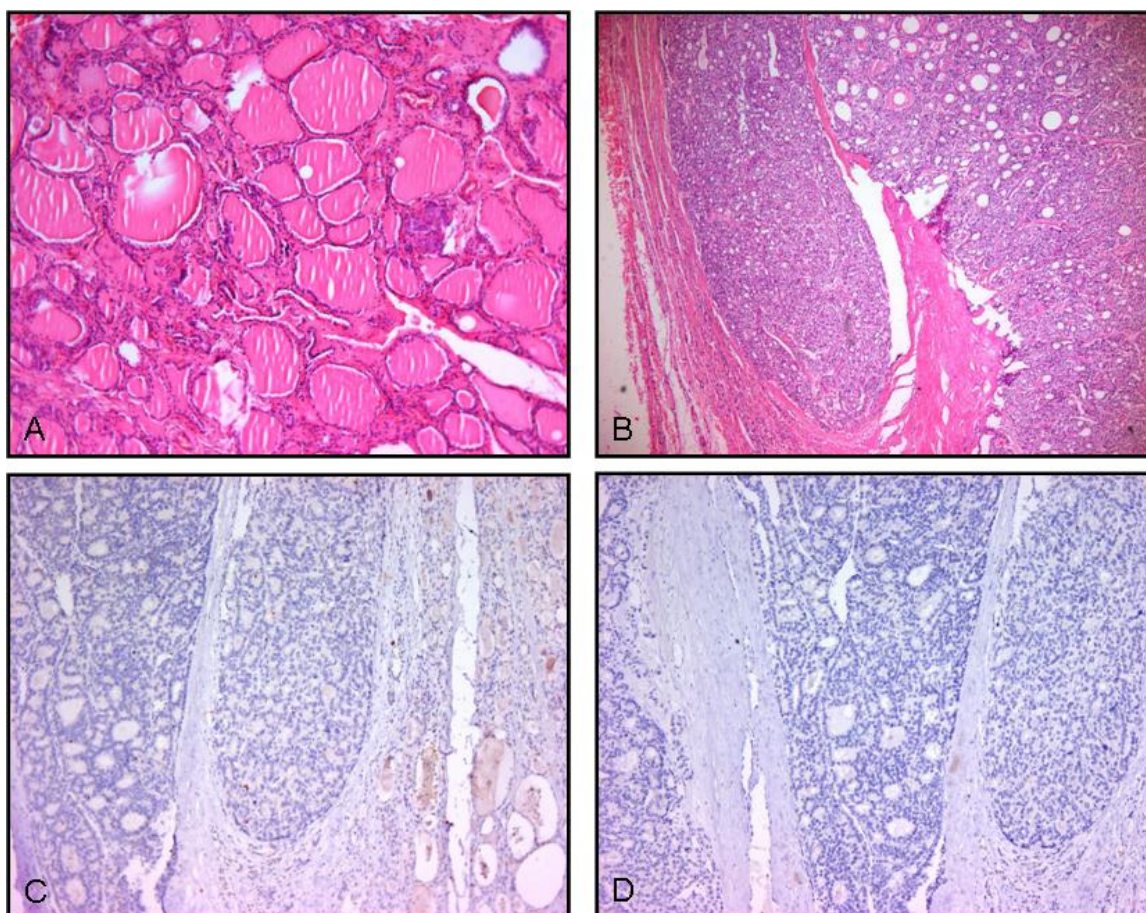
**Tabela 2.** Características demográficas, tumorais e sua relação com a expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 com doenças malignas.

Paciente	Idade	Sexo	Localização	Tamanho	Doença	Infiltração angiolinfática	MAGE- A4	MAGE- C1
1	51	F	Lobo D	4,5	Folicular	-	-	-
2	39	F	Lobo D	5,8	Folicular	-	-	-
3	28	F	Lobo E	1,7	Folicular	+	-	-
4	71	F	Lobo E	2,5	Folicular	-	-	-
5	37	F	Lobo D	1,8	Folicular	+	-	-
6	55	M	Lobo E	5,0	Folicular	+	-	-
7	43	F	Lobo D	8,0	Folicular	-	-	-
8	48	M	Lobo D	2,5	Folicular	+	-	-
9	49	F	Lobo E	3,5	Folicular	+	-	-
10	45	F	Lobo D	6,0	Folicular	-	-	-
11	64	M	Lobo D	4,0	Folicular	+	-	-
12	42	F	Lobo E	3,0	Folicular	-	-	-
13	71	F	Lobo D	2,5	Folicular	-	-	-
14	53	F	Lobo E	4,0	Folicular	-	-	-
15	20	F	Lobo E	4,0	Folicular	-	-	-
16	50	F	Lobo D	3,5	Folicular	-	-	-
17	44	F	Lobo D	0,6	Papilífero	-	-	-
18	78	F	Lobo D	4,2	Papilífero	+	-	-
19	56	F	Lobo E	5,0	Papilífero	-	-	-
20	46	F	Lobo D	6,0	Papilífero	+	-	-
21	62	F	Lobo D	2,8	Papilífero	-	-	-
22	75	M	Lobo E	3,5	Papilífero	+	-	-
23	39	F	Lobo D	3,0	Papilífero	+	-	-
24	29	F	Lobo D	2,5	Papilífero	+	-	-
25	55	F	Lobo D	6,0	Papilífero	-	-	-
26	62	F	Lobo E	1,5	Papilífero	-	-	-
27	39	F	Lobo D	1,5	Papilífero	-	-	-
28	58	F	Lobo D	2,7	Papilífero	+	-	-
29	24	M	Lobo D	3,6	Papilífero	+	-	-
30	34	F	Lobo E	3,0	Papilífero	+	-	-
31	23	F	Lobo E	1,2	Papilífero	+	-	-
32	40	F	Lobo D	1,6	Papilífero	-	-	-
33	21	F	Lobo E	5,0	Papilífero	-	-	-
34	69	F	Lobo D	3,2	Papilífero	-	-	-
35	74	F	Lobo D	2,3	Papilífero	-	-	-
36	78	F	Lobo E	3,9	Papilífero	-	-	-
37	26	F	Lobo D	1,6	Papilífero	+	-	-
38	21	F	Lobo E	3,8	Papilífero	-	-	-
39	60	F	Lobo E	4,5	Papilífero	+	-	-
40	59	M	Lobo D	8,0	Papilífero	+	-	-

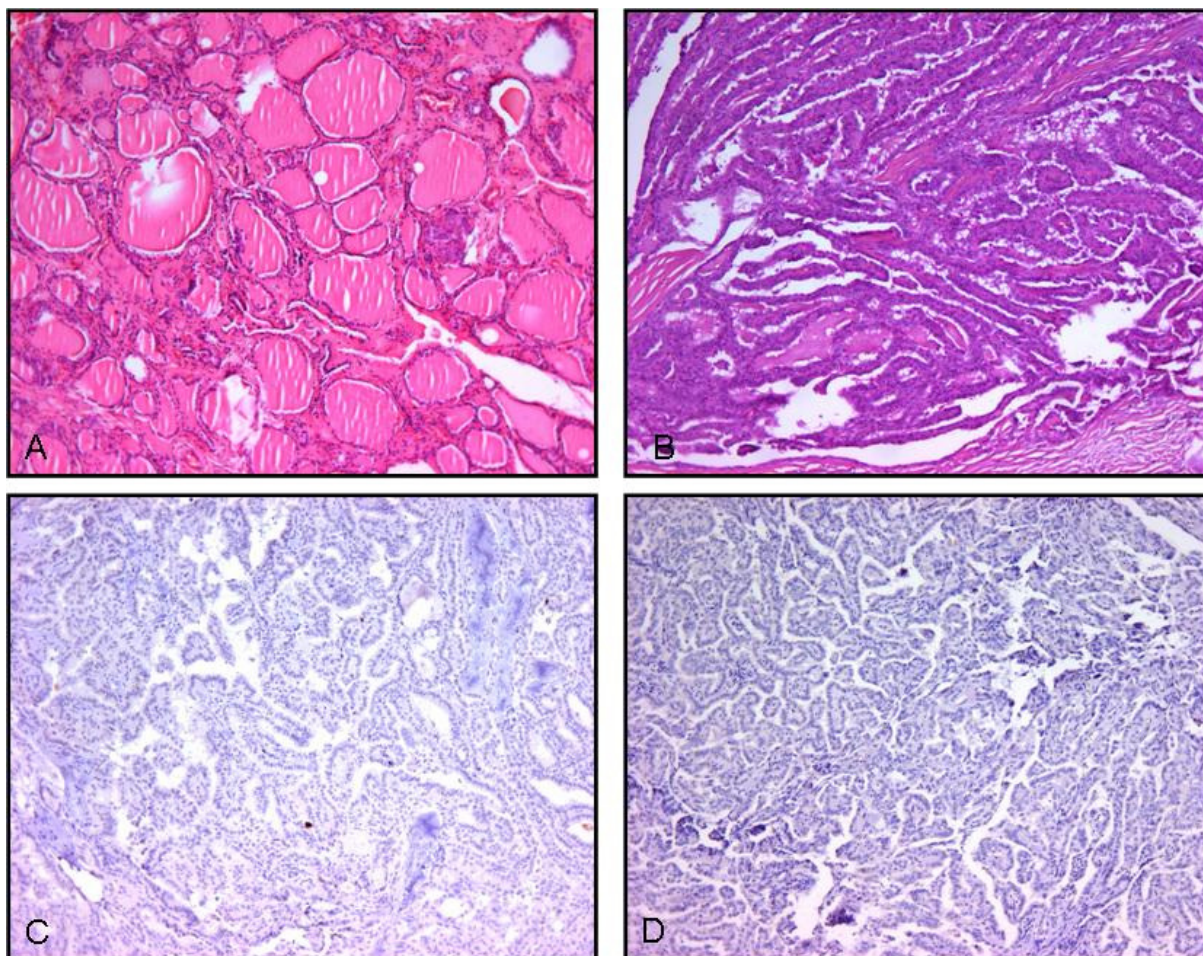
Ao considerar a casuística para as doenças malignas, a distribuição, segundo o sexo, revelou que 85% dos pacientes com doenças foliculares malignas eram mulheres, com proporção entre mulheres e homens de 8,5:1,5.

A média de idade para essa doença foi de 48,45 anos, com desvio padrão de 17,0 anos e mediana de 48 anos. Na avaliação clínica, podemos observar que o tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de  $3,63 \pm 1,73\text{cm}$  (0,6 a 8cm). No grupo com carcinoma folicular, a localização do tumor foi predominantemente no lobo direito em relação ao lobo esquerdo (1,5:1). Entre os casos de carcinoma papilífero, a localização do tumor foi em nove casos no lobo esquerdo e em 15, no lobo direito. A invasão angiolinfática foi observada em 37,5% dos pacientes com carcinomas foliculares e 50% dos pacientes com carcinoma papilífero.

Para os tumores malignos, o estudo da expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 foi negativa pelo método utilizado. A expressão dos anticorpos monoclonais 57B e CT7-33 dessas amostras está demonstrada nas Figuras 5 e 6. Nem mesmo nos casos avançados com invasão angiolinfática foram observadas imunomarcção positiva.



**Figura 5.** Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em carcinoma folicular. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x).



**Figura 6.** Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em carcinoma papilífero. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x).

Entre as amostras foliculares benignas, não houve associação entre essas doenças e a imunomarcção dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1, portanto sem significância estatística.

No grupo de amostras de doenças foliculares malignas, também não foi possível observar-se associação entre as doenças e a imunomarcção dos

antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1. Da mesma forma, não foi possível correlacionar essas características com os dados clínicos e macroscópicos coletados (idade e sexo do paciente, tamanho do nódulo, multicentricidade, invasão vascular e capsular, extensão extraglandular, presença de metástases ganglionares e hematogênicas), portanto sem significância estatística.

## **6. DISCUSSÃO**

---

### 6.1. Diagnóstico das doenças tireóideas

O diagnóstico das alterações tireóideas, como de todas as doenças do corpo humano, depende dos dados da história clínica, do exame físico e dos exames complementares. Entre esses exames destacam-se a PAAF e a USG que têm, ultimamente, emergido como ferramentas imprescindíveis no auxílio diagnóstico dos nódulos tireóideos, sendo utilizadas para melhorar a capacidade de identificar alterações patológicas de alto risco e orientar o início da terapêutica a ser adotada (DAVIES; WELCH, 2006). Porém, como a importância dessas alterações tem sido colocada em dúvida, pesquisas têm sido realizadas no mundo inteiro visando obter contribuições para que esse diagnóstico seja mais preciso. Foi com esse intuito que iniciamos este estudo.

Os tumores da tireóide, caracterizados por crescimento a partir das células foliculares, constituem as mais freqüentes lesões encontradas pelos patologistas, representando desafios na interpretação histopatológica. Como tumores de tireóide de padrão folicular, incluem-se desde lesões benignas (bócios adenomatosos e adenoma folicular) até lesões malignas (carcinoma folicular). Além desses, outros tipos de tumores tireóideos pertencentes a categorias diferentes podem se apresentar histologicamente com padrão folicular, como o carcinoma papilífero variante folicular e o carcinoma medular. As características histológicas e os critérios diagnósticos usados para distinguir entre essas lesões, freqüentemente são sutis e subjetivas (HIROKAWA *et al*, 2002; LIVOLSI; MERINO *et al*, 1994; SUSTER, 2006). Análises através da

imuno-histoquímica e estudos em biologia molecular têm sido utilizados na tentativa de esclarecer o diagnóstico, mas ainda não alcançaram um nível de confiança aceitável para serem introduzidos na rotina dos laboratórios de Patologia (CERILLI *et al*, 2002; WEBER *et al*, 2005). Por isso, impõe-se a necessidade de encontrar marcadores mais objetivos para, melhor que a morfologia clássica, caracterizar essas lesões. Embora vários marcadores tenham sido propostos, nenhum se mostrou específico e várias combinações têm sido experimentadas sem sucesso (PRASAD *et al*, 2005). Neste estudo, analisou-se por imuno-histoquímica, a expressão do MAGE-A4 e MAGE-C1 em 70 pacientes com diferentes tipos histológicos de doenças foliculares de tireóide (bócio colóide, adenoma folicular, carcinomas folicular e papilífero).

A imuno-histoquímica permite o estudo da expressão de proteínas e sua localização nos níveis celular e subcelular e, a partir da diversidade de anticorpos contra antígenos e células, pode definir as características dos tecidos saudáveis, doentes e diferenciá-los. O tecido tireóideo é também alvo desses estudos através de grande número de antígenos específicos identificados e dos anticorpos produzidos, possibilitando a caracterização de suas doenças (FAGGIANO *et al*, 2007). A dificuldade na distinção acontece mesmo entre as doenças benignas, como hiperplasia nodular e adenoma. Estudos moleculares indicam a origem monoclonal de nódulos dominantes em bócios multinodulares, podendo, portanto, representar neoplasias benignas na intimidade do processo hiperplásico (AESCHIMANN *et al*, 1993; APEL *et al*, 1995). Da mesma forma, os adenomas foliculares também têm origem monoclonal e, na ausência de comportamento agressivo ou marcadores de



---

carcinoma papilífero, são considerados neoplasias benignas (HICKS *et al*, 1990; NAMBA; MASTRUO; FAGIN, 1990).

Em virtude do padrão de expressão associado ao tumor, os CTAs têm merecido atenção como potenciais alvos na imunoterapia dos tumores (BOON ; COULIE; Van den EYNDE, 1997). Para as neoplasias da tireóide, Ruschenburg *et al* (1999) demonstraram a utilidade da expressão dos antígenos MAGE-A1 e GAGE-1/2 detectados na PAAF através de RT-PCR, no diagnóstico de nódulos tireóideos, eliminando as armadilhas da diferenciação citológica entre bócio adenomatoso e carcinoma papilífero.

Embora haja relatos usando outros marcadores moleculares (CAMPO *et al*, 1992; van HOEVEN; KOVATICH; MIETTINEN, 1998; KAMOSHIDA *et al*, 2000; PATEL *et al*, 2002; GUMURDULU *et al*, 2003; HAYNIK; PRAYSON, 2005; PRASAD *et al*, 2005; ZHANG *et al*, 2006; SAVIN, 2006; NONAKA *et al*, 2007; FAGGIANO *et al*, 2007), a literatura carece de estudos utilizando CTAs no diagnóstico das neoplasias benignas. Na avaliação de 30 casos estudados, não foram observadas expressões dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 nas doenças benignas e, não sendo possível, a partir dos resultados, correlacionar os marcadores com os dados clínicos e macroscópicos disponíveis (idade, sexo e tamanho do nódulo).

A definição do diagnóstico pelos patologistas de lesões malignas de origem folicular deve ser feita com muito cuidado, pois o exame de toda a cápsula da neoplasia deve ocorrer (YAMASHINA, 1992). Como toda a cápsula somente pode ser examinada depois da extirpação cirúrgica, devemos procurar identificar fatores prognósticos ou detectar a presença de potencial maligno

---

nesse tipo de doença, na hora do planejamento terapêutico, para que o mesmo seja adequado. Os carcinomas papilíferos com arquitetura folicular são freqüentemente diagnosticados como carcinoma folicular, o que denota a ausência de uma classificação histopatológica adequada que permita o diagnóstico correto e a indicação do tratamento e do prognóstico. Qualquer lesão com arquitetura folicular e aspecto nuclear característico deveria receber a classificação de carcinoma papilífero com variante folicular. Contudo, os critérios para esse diagnóstico são extremamente inconsistentes e controversos (SAXÉN *et al*, 1978; HIROKAWA *et al*, 2002; DeLELLIS *et al*, 2004). Os erros no diagnóstico, baseados nos parâmetros clínicos, levam a indicar terapêutica a pacientes como se eles fossem portadores de doenças de baixo risco, ou seja, condutas mais conservadoras como a tireoidectomia parcial e a ausência da necessidade de terapia adjuvante com iodo, são adotadas (SHAH *et al*, 1993; PASIEKA *et al*, 1992). Dessa maneira, existe a necessidade de termos marcadores específicos para identificar os tumores raros, agressivos e com potencial metastático para linfonodos cervicais, a fim de estratificar os pacientes com indicação de tireoidectomia total e iodoterapia.

Em relação às neoplasias malignas da glândula tireóide, havia poucos relatos sobre a expressão das proteínas CTAs e, principalmente, da família MAGE (RUSCHENBURG *et al*, 1999; MAIO *et al*, 2003; MILKOVIC; SARCEVIC; GLAVAN, 2006). A expressão das proteínas codificadas pelo MAGE-A4 e MAGE-C1 não havia sido investigada e, esta é a primeira descrição em neoplasias foliculares malignas da tireóide. Da mesma maneira que se observou com as doenças benignas, não se detectou expressão dos

---

antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 nos 40 casos de doenças malignas, inclusive naquelas com evidências clínicas e anatomopatológicas de agressividade (invasão angiolinfática). Dessa forma, não foi possível correlacionar os marcadores com os dados clínicos e histopatológicos disponíveis (idade, sexo, tamanho do nódulo, multicentricidade, invasões vascular e capsular, extensão extraglandular e presença de metástases ganglionares e hematogênicas).

Entre os trabalhos utilizando CTAs em doenças malignas da tireóide, Ruschenburg *et al* (1999) demonstraram a utilidade da expressão dos antígenos MAGE-A1 e GAGE-1/2 detectados na PAAF através de RT-PCR, como informação adicional para condução do carcinoma papilífero da tireóide. Nenhum dos casos benignos apresentou imunomarcagem positiva, indicando a especificidade do uso desses antígenos para caracterizar o carcinoma papilífero. Maio *et al* (2003) avaliaram a expressão de CTAs em amostras de 23 pacientes com diagnóstico de carcinoma medular esporádico da tireóide. NY-ESO-1 foi expresso em 54,5% dos casos, embora tenham sido pesquisados RAGE, MAGE-A1 a A4, BAGE, CAGE1-6, SSX1-5. Os antígenos RAGE, MAGE-A4 (gene utilizado em nosso estudo) e GAGE-1/2 não foram expressos. O SSX2 foi expresso em uma amostra, enquanto BAGE, GAGE-1 a 6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3 e SSX1 a 5 foram detectados em 2/5 das amostras. A expressão de NY-ESO-1 esteve significativamente relacionada com a recidiva tumoral, além de ter sido detectada no plasma dos pacientes analisados, sugerindo sua utilidade no seguimento dos pacientes. Milkovic; Sarcevic e Glavan (2006) observaram a expressão do MAGE-A3 em 60 pacientes com diferentes tipos histológicos de carcinoma de tireóide. Esse

---

antígeno foi detectado em 80% dos carcinomas papilíferos, 23% dos foliculares, 20% dos medulares e 0% dos anaplásicos. Foi observada, também, reação intensa nos pacientes que apresentavam infiltração linfática e que, a expressão do MAGE-A3 nos carcinomas papilíferos tinha relação inversa com o tamanho dos tumores. Esses achados indicam uma possível participação do gene nas etapas iniciais da carcinogênese tireóidea antecipando os passos da história natural da doença, além da sua utilidade no diagnóstico histopatológico. Nos 40 espécimes com tumor maligno analisados na amostra deste estudo, não se observou expressão do MAGE-A4 e MAGE-C1.

## **6.2. Mecanismos de ação dos CTAs**

Os CTAs são assim denominados em função do seu padrão de expressão, pois são encontrados em vários tipos de câncer e somente em células germinativas testiculares, entre os tecidos normais (BOON; COULIE; Van den EYNDE, 1997). Eles foram inicialmente identificados porque codificam antígenos tumorais reconhecidos por células T citotóxicas e, portanto, têm capacidade de induzir resposta autoimune em pacientes com melanoma ou outros tumores (DUFFOUR *et al*, 1999). Estudos subsequentes, usando análises sorológicas identificaram múltiplas famílias de CTAs. Atualmente, mais de 44 antígenos foram identificados como: MAGE, GAGE, BAGE, NY-ESO-1 e CT7 (SCANLAN; SIMPSON; OLD, 2004). Entre esses, os antígenos NY-ESO-1, MAGE-A3 e MAGE-A4 têm sido objeto de estudos como alvos em ensaios clínicos de vacinas para vários tipos de tumores, como carcinomas do pulmão,

do ovário, do trato gastrointestinal e de bexiga (SCANLAN *et al*, 2004; DAVIS *et al*, 2004).

Embora os dados indiquem que a expressão dos CTAs possa contribuir para a tumorigênese, seu papel biológico nas células da linhagem germinativa e nos tumores permanece pouco compreendido, pois os mecanismos envolvidos na patogênese tumoral estão em fase de experimentação. É evidente a dificuldade de um único marcador ser capaz de identificar todas as doenças de padrão folicular da glândula tireóide, portanto uma combinação entre os já identificados tem sido proposta. Com esses marcadores caracterizados, validados e conduzidos através de um perfil molecular das lesões tireóideas, será possível reconhecer as características morfológicas, comportamentais e prognósticas (HUANG *et al*, 2001). Quando estiverem disponíveis na rotina laboratorial irão facilitar a ação dos médicos que atendem doenças da tireóide.

Em cabeça e pescoço, os estudos com CTAs iniciaram-se com Iwamoto *et al* (1997) ao analisarem a presença de MAGE-A4 em amostras de sangue de pacientes com carcinoma de células escamosas de diferentes localizações, obtendo expressão significativa nesses casos e com provável utilidade no monitoramento de recidivas. Prasad *et al* (2004) estudaram em melanomas de mucosa oral e nasal (40 casos iniciais, 15 recidivas e 15 metástases) a expressão de CTAs e obtiveram imunomarcagem positiva para os antígenos MAGE-C1, MAGE-A4 e NY-ESO-1 em 73%, 61% e 24% dos tumores, respectivamente, com 81% dos casos expressando, pelo menos, um deles. Entretanto, os autores não obtiveram correlação com a progressão da doença

---

e com a sobrevida total. Utilizando a técnica RT-PCR, Ries *et al* (2005) identificaram a presença da família MAGE (A1 a A6) em 21 pacientes com CEC de cavidade oral. Obtiveram 71% de expressão de, pelo menos, um dos CTAs estudados e observaram que o padrão da expressão foi heterogêneo, pois, 62% da amostra foi positiva para MAGE-A3, 57% para MAGE-A4, 48% para MAGE-A6, 43% para MAGE-A1, 38% para MAGE-A2 e 24% para MAGE-A5. Recentemente, Mollaoglu *et al* (2008) avaliaram a expressão do MAGE-A12 em 52 casos de CEC de cavidade oral e obtiveram imunomarcção positiva em 49,1% das amostras analisadas. A correlação entre lesões malignas e a detecção de MAGE-A12 foi estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

Atanackovic *et al* (2006) utilizaram 23 antígenos CTAs em seu estudo com 51 pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço e obtiveram, por RT-PCR: MAGE-A3 expresso em 72%, SSX1 em 45%, MAGE-C2 em 33%, MAGE-C1 em 28%, BAGE em 17%, SSX2 em 16%, SCP1 em 12%, NY-ESO-1 em 6% e HOM-TES-85 em 4% dos casos. Oitenta e seis por cento das amostras expressaram, pelo menos, um dos antígenos, 69%, pelo menos, dois e 43%, pelo menos, três desses antígenos. Pela primeira vez fez-se uso do MAGE-C1 (CT7) e no final os autores sugeriram a utilização da imunoterapia antígeno específica polivalente. Mas, um grande impulso foi dado pelos achados de Figueiredo *et al* (2006) para os antígenos MAGE-A1, MAGE-A4, MAGE-A10, MAGE-A12, BAGE, GAGE-1, LAGE-1, NY-ESO-1 e PRAME em CEC de boca, de faringe e de laringe ao observarem que a expressão de, pelo menos, um dos antígenos ocorreu em 66,6% dos casos, com maior imunomarcção entre os tumores avançados (100% - T4, 57% - T3, 50% - T1 e

---

T2) e que o antígeno PRAME esteve sempre presente nos linfonodos metastáticos. Essas informações nos animaram a continuar esses estudos, agora com tumores da tireóide.

O antígeno MAGE-A4 foi analisado pela primeira vez por Eura *et al* (1995) identificando-o em 26,5% dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. Na análise de Figueiredo *et al* (2006), a positividade desse antígeno foi de 48,5% dos casos. Por outro lado, Groeper *et al* (2007) também demonstraram a imunomarcação do MAGE-A4 relacionado às moléculas HLA-A2 em câncer de pulmão. Rigopoulou *et al* (1994) observaram uma frequência de antígenos HLA-A2 em carcinomas papilífero de 50% e folicular de 67%; embora esses valores não tenham demonstrado envolvimento na carcinogênese desses tumores, uma vez que no grupo controle obtiveram-se 45%. Esses autores observaram que no grupo de carcinoma folicular de tireóide não foi demonstrada associação com a presença de HLA, sugerindo que a etiopatogênese de cada tipo de câncer seja diferente. Rigopoulou *et al* (1994) ainda identificaram outros subtipos de HLA nos tumores de tireóide. Portanto, baseado nessas informações, seria esperado a expressão de MAGE-A4 em todos os grupos analisados em nosso estudo. Não foi o que encontramos. No entanto, fundamentando o fraco desempenho entre os tumores de tireóide, encontramos na literatura valores pequenos de expressão desse antígeno, com variação de 0 a 4,8 %, como ocorreu com os tumores de ovário, de fígado e carcinoma medular da tireóide (GILLESPIE *et al*, 1998; LUO *et al*, 2002; MAIO *et al*, 2003).

Rimoldi *et al* (2000) e Jungbluth *et al* (2005) demonstraram o elevado grau de semelhança entre os membros da família MAGE-A e sua freqüente co-expressão em tumores. Em conseqüência, anticorpos monoclonais produzidos contra a família MAGE-A podem apresentar reação cruzada. Por exemplo, o anticorpo monoclonal 57B foi originalmente produzido contra o antígeno MAGE-A3, mas análises adicionais propuseram reatividade contra vários outros membros da família MAGE-A, principalmente MAGE-A4.

O gene MAGE-C1 - anticorpo CT7-33 - foi estudado, inicialmente, por Atanackovic *et al* (2006) em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP), quando obtiveram 28% de expressão. No nosso estudo, pela primeira vez, analisamos a expressão desse antígeno em tumores de tireóide. Jungbluth *et al* (2005) demonstraram a imunomarcção para MAGE-C1 em 82% das amostras de mieloma no estágio III, com intensidade maior de reação em doença avançada. Os autores observaram também elevados níveis plasmáticos do antígeno, correlacionando-os à elevada proliferação de células plasmáticas. Esses resultados sugerem uma conexão entre o antígeno MAGE-C1 e a desregulação do controle do ciclo celular. Além disso, sugerem mecanismos que podem contribuir com a patogênese do mieloma múltiplo. O MAGE-C1 é estruturalmente único entre os CTAs e estudos anteriores não têm demonstrado reação cruzada do anticorpo CT7-33 com outras proteínas (JUNGBLUTH *et al*, 2002).

Em 2002, Jungbluth *et al* detectaram que os carcinomas de bexiga (66%), de fígado (60%), de pulmão (39%) e metástase de melanoma (82%) exibiam alta incidência da expressão antigênica de MAGE-C1, entretanto o



---

padrão da imunomarcacão foi predominantemente heterogêneo. Essa heterogeneidade parece ser uma característica morfológica de todos os CTAs em muitos tipos de tumores. Alguns tumores apresentam expressão fraca do antígeno MAGE-C1, como verificado em sarcomas sinoviais, carcinomas colônico, de células renais e de cabeça e pescoço (JUNGBLUTH *et al*, 2002). Portanto, os tumores necessitam ser avaliados sobre o padrão da expressão alcançada por esse antígeno antes de imaginar atitudes diagnósticas e terapêuticas. Em nossa amostra não houve expressão do MAGE-C1

### **6.3. Características biológicas dos CTAs**

Tanto quanto no testículo, a expressão heterogênea, ou seja, marcante variação no padrão da expressão protéica dos CTAs, também foi observada nos tumores malignos por Scanlan *et al* (2002) e Zendman *et al* (2003). É possível que a expressão heterogênea seja decorrente do estágio diferente a que cada célula se situa devido a diferentes estímulos a que ela está sujeita. Essa heterogeneidade pode dificultar a ação imunológica do anticorpo, uma vez que a falta de expressão significa falta de antígeno. Sigalotti *et al* (2004) afirmam ser a metilação a responsável pelo fenômeno e chegam a indicar terapêutica para diminuir esse efeito em melanoma.

A expressão de diferentes CTAs é, muitas vezes, simultânea, sugerindo que são ativados por mecanismos comuns (LUCAS *et al*, 1998; De BACKER *et al*, 1999). Essa expressão simultânea é denominada co-expressão dos antígenos tumorais, devido, provavelmente, à ativação gênica pela demetilação que ativaria qualquer um desses genes (SCANLAN *et al*, 2002). A demetilação

---

genômica que ocorre com a progressão tumoral gera também a expressão de múltiplos genes, geralmente em fases diferentes da progressão (FIGUEIREDO *et al*, 2006).

Em vários tipos de tumores, a co-expressão de CTAs está associada com doença avançada e mau prognóstico, como citado por Gure *et al* (2005), ao estudarem carcinomas de pequenas células de pulmão e constatarem que a co-expressão de CTAs mostra significativa associação com doença linfonodal, estágio patológico avançado, bem como invasão pleural (GURE *et al*, 2005). No mesmo estudo, a NY-ESO-1 e o MAGE-A3 se mostraram com maior expressão ao se correlacionarem com mau prognóstico. No câncer colorretal, a expressão do antígeno NY-ESO-1 parece ser útil como marcador de metástase e de doença avançada, enquanto a expressão de MAGE-A4 está significativamente associada à presença de invasão vascular pelo tumor (LI *et al*, 2005). Da mesma forma, a co-expressão de MAGE-A1, de MAGE-A3, de MAGE-A4, de CT7 e de NY-ESO-1 em gamopatias malignas correlacionam-se com o estadió e agressividade da doença (DHODAPKAR *et al*, 2003). A co-expressão de SSX-1, -2, -4 e -5 também se correlaciona com prognóstico ruim em pacientes com mieloma múltiplo (TAYLOR *et al*, 2005).

Cho *et al* (2006) sinalizam sobre a possibilidade de genes CTAs exercerem e/ou regularem suas atividades através de interações específicas com outros CTAs. Segundo eles, essa interação pode ser devido à ligação com outras proteínas. Esses autores citam a interação positiva entre MAGE-C1 e NY-ESO-1, que podem não se vincularem mutuamente, mas serem parte de um complexo multiprotéico.

---

A expressão dos diferentes CTAs em tumores está correlacionada positivamente, sugerindo que esses genes podem ser ativados através de um mecanismo comum. A expressão de CTAs em tumores pode ser o resultado da ativação de um programa coordenado, ao invés de eventos independentes. Além disso, a análise da expressão desses antígenos em várias linhagens celulares de tumores sugere que a expressão coordenada de MAGE-C1 e de NY-ESO-1 pode ser um evento comum em um conjunto de cânceres. Ao mesmo tempo, esses dados identificam uma nova interação entre CTAs. Estudos adicionais para identificar a influência funcional desse mecanismo podem revelar se a interação entre essas duas proteínas desempenha um papel na tumorigênese.

#### **6.4. A ausência de expressão**

A falta de expressão ocorre por dois mecanismos: (1) a expressão não foi detectada pelo método utilizado, ou (2) a expressão do antígeno depende de estímulos e esses não se fizeram presentes nesta amostra.

A expressão não foi detectada por falta de validade dos anticorpos ou pela falta de sensibilidade do método utilizado. A grande maioria dos trabalhos citados analisa a expressão dos antígenos usando a técnica da PCR, que é de muito boa qualidade e confiabilidade, porém, é uma técnica muito trabalhosa, além de necessitar de laboratório especial para sua realização, sendo, pois, de resultado demorado, retardando a aplicação de ações imediatas ao paciente.

A mudança de método do RT-PCR para imuno-histoquímica não deve ter sido o responsável pelo fracasso obtido, uma vez que Jungbluth *et al* (2002)

e Sharma *et al* (2006) já demonstraram, que tanto a imuno-histoquímica quanto a PCR fornecem resultados semelhantes da expressão dos genes. A hipótese de que a expressão não foi detectada porque os anticorpos utilizados estavam com validade vencida não pode ser aceita porque ele foi adquirido de firma idônea, a data não foi ultrapassada e, em outros experimentos houve imunomarcção, além de serem positivos nas amostras de testículos (controles positivos).

A expressão constatada por Iwamoto *et al* (1997), Prasad *et al* (2004) e Ries *et al* (2005) para o MAGE-A4 em câncer de cabeça e pescoço, não foi detectada neste estudo, porque esse antígeno não está expresso na glândula tireóide, como já fora sugerido por Maio *et al* (2003) em carcinoma medular da tireóide. O mesmo se pode dizer a respeito do gene MAGE-C1 que também não foi expresso em nossa amostra, como sugeria Jungbluth *et al* (2002) ao obterem expressão fraca em CEC de cabeça e pescoço. A degeneração maligna dos tecidos é um processo multifatorial, nos quais estão envolvidos elementos genéticos e ambientais, cuja contribuição varia, consideravelmente, entre raças, entre diferentes tipos de tumores e até de indivíduo para indivíduo. Tajima *et al*, em 2003, demonstraram esse fato ao detectarem que as expressões do NY-ESO-1 em carcinoma de pulmão diferiam significativamente entre japoneses e caucasianos.

Os mecanismos envolvidos na patogênese tumoral são obscuros e, ainda, em fase de experimentação. Os antígenos HLA têm sido relacionados como fatores genéticos que influenciam o desenvolvimento (positiva ou negativamente) dos tumores. A família dos antígenos MAGE codificam um

---

grupo de peptídeos antigênicos apresentados por moléculas HLA classe I e reconhecidos por linfócitos T. Rigopoulou *et al* (1994) analisaram a presença de antígenos HLA classe I (-A, -B, -C) e HLA classe II (-DR, -DQ) em câncer de tireóide, cuja frequência era razão de controvérsia entre os estudos. Observaram em ambas, classe I e classe II, fatores de susceptibilidade para o carcinoma papilífero e que a sua presença variava conforme as populações investigadas. Esses autores constataram que entre os espanhóis, os subtipos B35 e DR11 foram os mais freqüentes, à semelhança com a população do norte da África, não arábicos, e diferentes dos italianos (B35 e DR1), dos americanos (DR7) e dos alemães. Nesses últimos (alemães), detectou-se o predomínio de três subtipos (B62, DR5 e DR6). Da mesma forma, Kobayashi *et al* (2003) divulgaram a descoberta de um novo peptídeo antigênico MAGE-A4 (alelo a) apresentado por moléculas HLA-A1, expressas em diferentes grupos étnicos: negros (9%), caucasóides (26%), orientais (7%) e ameríndios (11%).

Tais observações nos conduzem a algumas reflexões: (1) fatores ambientais (geográficos) influenciariam a estrutura genética das moléculas HLA nos tumores, assim como (2) fatores étnicos e/ou genéticos. Além dessas, são sugeridos (3) cofatores como vírus, tabaco, bebida alcoólica, radiação ultravioleta, radiação ionizante intensificando a ação dos fatores genéticos HLA a induzir câncer. A influência dos fatores ambientais e genéticos poderiam ser os principais responsáveis pela patogênese dos tumores, levando à (1) participação de genes fora do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) nas etapas do processo, (2) a estímulos diferentes sobre as moléculas HLA classe I ou classe II gerando resposta celular ou humoral e, ainda, (3) a

determinar respostas imunológicas diferentes, podendo gerar a presença de um dos dois alelos para o MAGE-A4 (RIGOPOULOUS *et al*, 1994).

Os avanços no conhecimento da moderna biologia molecular nas doenças tireóideas poderão identificar marcadores que possibilitem uma acurada caracterização dos tipos e subtipos de doenças benignas e malignas em amostras histológicas e células obtidas a partir da PAAF. Os CTAs, genes promissores para essa função, são expressos em pequenos grupos de tumores humanos e em alguns casos deve-se procurar identificar outros CTAs devido aos fenômenos a que estão sujeitos, ou seja, a heterogeneidade, a co-expressão e a interação entre genes. A presença da heterogeneidade sugere o desenvolvimento de vacinas polivalentes contendo epitopos de dezenas de antígenos codificados por esses genes (GOMBOS *et al*, 2007 - utilizaram 20.000 genes), porém a co-expressão e a interação entre genes poderão restringir esse número para 6 a 10 anticorpos (KRAUSE *et al*, 2008).

Enquanto a incidência de muitas neoplasias malignas da região da cabeça e pescoço encontra-se em declínio, os cânceres da tireóide, como observado por Shaha; Shah e Loree (1998) apresentam um aumento dos casos diagnosticados. Embora a incidência aumentada de doenças malignas da tireóide possa se relacionar à detecção dos nódulos com a popularização da USG, a combinação de detecção precoce e a probabilidade de diagnóstico de câncer em alterações aparentemente pouco importantes, reforçam a necessidade de métodos não cirúrgicos para a diferenciação de doenças benignas e malignas e a indicação dos cânceres de alto risco para recidiva e metástase.

## **7. CONCLUSÃO**

---

A partir dos resultados obtidos podemos observar que:

- não houve expressão antigênica do MAGE-A4 e MAGE-C1 nas amostras de doenças benignas e malignas da glândula tireóide; e, portanto, a análise da correlação foi inviável.



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

AESCHIMANN S, KOPP PA, KIMURA ET, ZBAEREN J, TOBLER A, FEY MF, STUDER H. Morphological and functional polymorphism within clonal thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep;77(3):846-51, 1993.

ANDERSON JB, WEBB AJ. Fine-needle aspiration biopsy and the diagnosis of thyroid cancer. *Br J Surg, Apr;* 74(4): 292-6, 1987.

APEL RL, EZZAT S, BAPAT BV, PAN N, LIVOLSI VA, ASA SL. Clonality of thyroid nodules in sporadic goiter. *Diagn Mol Pathol,* Jun; 4(2): 113-21, 1995.

ASA SL. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. *Endocr Pathol.* Winter; 16(4): 295-309, 2005.

ASHCRAFT MW, van HERLE AJ. Management of thyroid nodules II: scanning techniques, thyroid suppressive therapy, and fine needle aspiration. *Head Neck Surg,* Mar-Apr; 3(4): 297-322, 1981.

ASP AA, GEORGITIS W, WALDRON EJ, SIMS JE, KIDD GS 2nd. Fine needle aspiration of the thyroid. *Am J Med,* Sep; 83(3): 489-93, 1987.

ATANACKOVIC D, BLUM I, CAO Y, WENZEL S, BARTELS K, FALTZ C, HOSSFELD DK, HEGEWISCH-BECKER S, BOKEMEYER C, LEUWER R. Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.,* Sep; 5(9): 1218-25, 2006.

BALOCH ZW, LIVOLSI VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol,* 117(1): 143–150, 2002.

BANDIĆ D, JURETIĆ A, SARCEVIĆ B, SEPAROVIĆ V, KUJUNDZIĆ-TILJAK M, HUDOLIN T, SPAGNOLI GC, COVIĆ D, SAMIJA M. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat Med J.,* Feb; 47(1): 32-41, 2006.

BARTALENA L, BOGAZZI F, PINCHERA A. Thyroid function tests and diagnostic protocols for investigation of thyroid dysfunction. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 27(3): 531-9, 1991.

BARTOLAZZI A, GASBARRI A, PAPOTTI M, BUSSOLATI G, LUCANTE T, KHAN A, INOHARA H, MARANDINO F, ORLANDI F, NARDI F, VECCHIONE A, TECCE R, LARSSON O; Thyroid Cancer Study Group. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet*, May 26; 357(9269): 1644-50, 2001.

BASOLO F, POLLINA L, FONTANINI G, FIORE L, PACINI F, BALDANZI A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. *Br J Cancer.*; 75(4):537-41, 1997.

BENNEDBAEK FN, PERRILD H, HEGEDÜS L. Diagnosis and treatment of the solitary thyroid nodule. Results of a European survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Mar; 50(3): 357-63, 1999.

BENSEÑOR I. Screening for thyroid disorder in asymptomatic adults from Brazilian populations. *São Paulo Med J/Rev Paul Med*, 120(5): 146-51, 2002.

BIANCO AC, MARONE MMS, CORREA PHS. Valor clínico da dosagem ultrasensível de TSH na avaliação da função tiroideana. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, 32(2): 51-4, 1988.

BLUM M. The diagnosis of the thyroid nodule using aspiration biopsy and cytology. *Arch Intern Med.*, Jun; 144(6): 1140-2, 1984.

BODEY B. Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.*, Aug; 2(6): 577-84, 2002.

BOON T, COULIE PG, Van den EYNDE B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today*, 18: 267- 8, 1997.

BRASSEUR F, RIMOLDI D, LIENARD D *et al.* Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 63: 375, 1995.

BROWN RS. Immunoglobulins affecting thyroid growth: a continuing controversy. *J Clin Endocrinol Metab.*, May; 80(5): 1506-8, 1995.

BURCH HB. Evaluation and management of the solid thyroid nodule. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 24: 663-710, 1995.

BUTCH RJ, SIMEONE JF, MUELLER PR. Thyroid and parathyroid ultrasonography. *Radiol Clin North Am.*, Mar; 23(1): 57-71, 1985.

CAMPO E, MERINO MJ, LIOTTA L, NEUMANN R, STETLER-STEVENSON W. Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. *Hum Pathol*, Dec; 23(12): 1395-401, 1992.

CAPPELLI C, CASTELLANO M, PIROLA I, GANDOSSO E, DE MARTINO E, CUMETTI D, AGOSTI B, ROSEI EA. Thyroid nodule shape suggests malignancy. *Eur J Endocrinol*, Jul; 155(1): 27-31, 2006.

CERILLI LA, MILLS SE, RUMPEL CA, DUDLEY TH, MOSKALUK CA. Interpretation of RET immunostaining in follicular lesions of the thyroid. *Am J Clin Pathol.*; 118: 186-193, 2002.

CHEN Q, JACKSON H, PARENTE P, LUKE T, RIZKALLA M, TAI TY, ZHU HC, MIFSUD NA, DIMOPOULOS N, MASTERMAN, KA, *et al.* Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jun 22; 101(25): 9363-8. 70, 2004.

CHEN YT, GÜRE AO, TSANG S, STOCKERT E, JÄGER E, KNUTH A, OLD LJ. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jun 9; 95(12): 6919-23, 1998.

CHO HJ, CABALLERO OL, GNJATIC S, ANDRADE VC, COLLEONI GW, VETTORE AL, OUTTZ HH, FORTUNATO S, ALTORKI N, FERRERA CA, CHUA R, JUNGBLUTH AA, CHEN YT, OLD LJ, SIMPSON AJ. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer Immun.*, Dec 1; 6: 12, 2006.

COELI CM, BRITO AS, BARBOSA FS, RIBEIRO MG, SIEIRO APAV VAISMAN M. Incidência e mortalidade por câncer da tireóide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 49(4): 503-9, 2005.

COOPER DS, DOHERTY GM, HAUGEN BR, *et al.*: Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 16(2): 109-142L, 2006.

DAVIES L, WELCH HG: Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973 - 2002. *JAMA*, May 10; 295(18): 2164-7, 2006.

DAYAN CM, DANIELS GH. Medical progress: chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med.*, Jul; 335(2): 99-107, 1996.

DAVIS ID, CHEN W, JACKSON H, PARENTE P, SHACKLETON M, HOPKINS W, CHEN Q, DIMOPOULOS N, LUKE T, MURPHY R, SCOTT AM, MARASKOVSKY E, MCARTHUR G, MACGREGOR D, STURROCK S, TAI TY, GREEN S, CUTHBERTSON A, MAHER D, MILORADOVIC L, MITCHELL SV, RITTER G, JUNGBLUTH AA, CHEN YT, GNJATIC S, HOFFMAN EW, OLD LJ, CEBON JS. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10697-702. Epub 2004 Jul 13.

De BACKER O, ARDEN KC, BORETTI M, VANTOMME V, DE SMET C, CZEKAY S, VIARS CS, DE PLAEN E, BRASSEUR F, CHOMEZ P, VAN DEN EYNDE B, BOON T, van der BRUGGEN P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.*, Jul 1; 59(13): 3157-65, 1999.

de GEUS-OEI LF, PIETERS GF, BONENKAMP JJ, *et al.*: 18F-FDG PET reduces unnecessary hemithyroidectomies for thyroid nodules with inconclusive cytologic results. *J Nucl Med*, 47: 770-775, 2006.

De PLAEN E, ARDEN K, TRAVERSARI C, GAFORIO JJ, SZIKORA JP, DE SMET C, BRASSEUR F, VAN DER BRUGGEN P, LETHÉ B, LURQUIN C *et al.* Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40(5): 360-9, 1994.

---

DeGROOT LJ, KAPLAN EL, McCORMICK M, STRAUS FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, Aug; 71(2): 414-24, 1990.

DeLELLIS RA, WILLIAMS ED. Thyroid and parathyroid tumours: introduction. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (eds). *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC Press; 51-6. 2004.

DHODAPKAR MV, OSMAN K, TERUYA-FELDSTEIN J, FILIPPA D, HEDVAT CV, IVERSEN K, KOLB D, GELLER MD, HASSOUN H, KEWALRAMANI T, COMENZO RL, COPLAN K, CHEN YT, JUNGBLUTH AA. Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease. *Cancer Immun*; 3: 9, 2003.

Dos SANTOS LRM. Thyroid cancer: symptoms, diagnosis and treatment. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço*, 34(2): 27-31, 2005.

DUFFOUR MT, CHAUX P, LURQUIN C, CORNELIS G, BOON T, van der BRUGGEN P. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol.*, Oct; 29(10): 3329-37, 1999.

DUH QY, SANCHO JJ, GREENSPAN FS, HUNT TK, GALANTE M, DELORIMIER AA, CONTE FA, CLARK OH. Medullary thyroid carcinoma. The need for early diagnosis and total thyroidectomy. *Arch Surg.*, Oct; 124(10): 1206-10, 1989.

DUMONT JE, LAMY F, ROGER P, MAENHAUT C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev.*, Jul; 72(3): 667-97, 1992.

EMERICK GT, DUH QY, SIPERSTEIN AE, BURROW GN, CLARK OH. Diagnosis, treatment, and outcome of follicular carcinoma. *Cancer*, Dec 1; 72(11): 3287-95, 1993.

EURA M, OGI K, CHIKAMATSU K, LEE KD, NAKANO K, MASUYAMA K, ITOH K, ISHIKAWA T. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer*, Oct 20; 64(5): 304-8, 1995.

FAGGIANO A, CAILLOU B, LACROIX L, TALBOT M, FILETTI S, BIDART JM, SCHLUMBERGER M. Functional characterization of human thyroid tissue with immunohistochemistry. *Thyroid*, Mar; 17(3): 203-11, 2007.

FELD S, GARCIA M, BASKIN HJ, *et al.* AACE clinical practice guidelines for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocr Pract.*, Jan-Feb; 12(1): 63-102, 2006.

FERRAZ AR, BRANDÃO LG. BÓCIOS SIMPLES. IN: BRANDÃO LG, FERRAZ AR. *Cirurgia de Cabeça e Pescoço*. São Paulo: Roca; 1989. v.1; 569-81.

FIGUEIREDO DL, MAMEDE RC, PROTO-SIQUEIRA R, NEDER L, SILVA WA JR, ZAGO MA. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. Jul; 28(7): 614-9, 2006.

GAUGLER B, Van den EYNDE B, van der BRUGGEN P, ROMERO P, GAFORIO JJ, De PLAEN E, LETHÉ B, BRASSEUR F, BOON T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*, Mar 1;179(3): 921-30, 1994.

GILLESPIE AM, RODGERS S, WILSON AP, TIDY J, REES RC, COLEMAN RE, MURRAY AK. MAGE, BAGE and GAGE: tumour antigen expression in benign and malignant ovarian tissue. *Br J Cancer*. Sep; 78(6): 816-21, 1998.

GOMBOS K, ZELE E, KISS I, VARJAS T, PUSKÁS L, KOZMA L, JUHÁSZ F, KOVÁCS E, SZANYI I, EMBER I. Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. *Cancer Genomics Proteomics*. Nov-Dec; 4(6): 403-1, 2007.

GRANT CS, HAY ID, GOUGH IR, BERGSTRALH EJ, GOELLNER JR, MCCONAHEY WM. Local recurrence in papillary thyroid carcinoma: is extent of surgical resection important? *Surgery*, Dec; 104(6): 954-62, 1988.

GREBE SKG, HAY ID. Follicular cell-derived thyroid carcinoma. *Cancer Treat Res*, 89:91-140, 1997.

GROEPER C, GAMBAZZI F, ZAJAC P, BUBENDORF L, ADAMINA M, ROSENTHAL R, ZERKOWSKI HR, HEBERER M, SPAGNOLI GC.

Cancer/testis antigen expression and specific cytotoxic T lymphocyte responses in non small cell lung cancer. *Int J Cancer*. Jan 15; 120(2): 337-43, 2007.

GUMURDULU D, UGUZ A, ERDOGAN S, TUNCER I, DEMIRCAN O. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in different types of thyroid tumors: an immunohistochemical study. *Endocr Res.*, Nov; 29(4): 465-72, 2003.

GURE AO, CHUA R, WILLIAMSON B, GONEN M, FERRERA CA, GNJATIC S, RITTER G, SIMPSON AJ, CHEN YT, OLD LJ, ALTORKI NK. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 11: 8055-62, 2005.

HAGAG P, STRAUSS S, WEISS M: Role of ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy in evaluation of nonpalpable thyroid nodules. *Thyroid*, 8: 989-995, 1998.

HAJDU SI, MELAMED MR. Limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary neoplasms. *Acta Cytol.*, May-Jun; 28(3): 337-45, 1984.

HAMBURGER JI, MILLER JM, KINI SR. Lymphoma of the thyroid. *Ann Intern Med.*, Nov; 99(5): 685-93, 1983.

HAYNIK DM, PRAYSON RA. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax in follicular carcinomas of the thyroid. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Dec;14(4):417-21, 2006.

HEGEDUS L, BONNEMA SJ, BENNEDBAEK FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocr. Rev.*, 24: 102-32, 2003.

HEGEDUS L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med*, Oct 21; 351(17): 1764-71, 2004.

HICKS DG, LIVOLSI VA, NEIDICH JA, PUCK JM, KANT JA. Clonal analysis of solitary follicular nodules in the thyroid. *Am J Pathol*, 137: 553-562, 1990.



HIROKAWA M, CARNEY JA, GOELLNER JR, DELELLIS RA, HEFFESS CS, KATOH R, TSUJIMOTO M, KAKUDO K. Observer variation of encapsulated follicular lesions of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol.*, Nov; 26(11): 1508-14, 2002.

HOPKINS CR, READING CC. Thyroid and parathyroid imaging. *Semin Ultrasound CT MRI*, Aug; 16(4): 279-95, 1995.

HUANG Y, PRASAD M, LEMON WJ, HAMPEL H, WRIGHT FA, KORNACKER K, LIVOLSI V, FRANKEL W, KLOOS RT, ENG C, PELLEGGATA NS, DE LA CHAPELLE A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 18; 98(26): 15044-9, 2001.

HUNDAHL SA, FLEMING ID, FREMGEN AM, MENCK HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer*, Dec 15; 83(12): 2638-48, 1998.

ITO Y, TOMODA C, URUNO T, TAKAMURA Y, MIYA A, KOBAYASHI K, MATSUZUKA F, KUMA K, MIYAUCHI A. Needle tract implantation of papillary thyroid carcinoma after fine-needle aspiration biopsy. *World J Surg.*, Dec; 29(12): 1544-9, 2005.

IWAMOTO O, NAGAO Y, SHICHIJO S, EURA M, KAMEYAMA T, ITOH K. Detection of MAGE-4 protein in sera of patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer.* Jan 27; 70(3): 287-90, 1997.

JAGER E, GNJATIC S, NAGATA Y, STOCKERT E, JAGER D, KARBACH J, NEUMANN A, RIECKENBERG J, CHEN YT, RITTER G, *et al.* Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12198-12203, 2000.

JAKUBIAK-WIELGANOWICZ M, KUBIAK R, SYGUT J, POMORSKI L, KORDEK R. Usefulness of galectin-3 immunohistochemistry in differential diagnosis between thyroid follicular carcinoma and follicular adenoma. *Pol J Pathol.*, 54(2): 111-5, 2003.

---

JARLØV AE, NYGAARD B, HEGEDÜS L, *et al.* Observer variation in the clinical and laboratory evaluation of patients with thyroid dysfunction and goiter. *Thyroid*, May; 8(5): 393-8, 1998.

JENNINGS AS. Non-isotopic techniques for imaging the thyroid. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*, 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, 433.

JUNGBLUTH AA, CHEN YT, BUSAM KJ, COPLAN K, KOLB D, IVERSEN K, WILLIAMSON B, Van LANDEGHEM FK, STOCKERT E, OLD LJ. CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues. *Int J Cancer*. Jun 20; 99(6): 839-45, 2002.

JUNGBLUTH AA, ELY S, DILIBERTO M, NIESVIZKY R, WILLIAMSON B, FROSINA D, CHEN YT, BHARDWAJ N, CHEN-KIANG S, OLD LJ, CHO HJ. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood*. Jul 1; 106(1): 167-74, 2005.

KAMOSHIDA S, OGANE N, YASUDA M, MURAMATSU T, BESSHO T, KAJIWARA H, OSAMURA RY. Immunohistochemical study of type-1 blood antigen expressions in thyroid tumors: the significance for papillary carcinomas. *Mod Pathol.*, Jul; 13(7): 736-41, 2000.

KAPLAN MM. Evaluation Of Thyroid Nodules By Needle Biopsy. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2000, 224.

KAZAKOV DV, KUTZNER H, RUTTEN A *et al.* The anti-MAGE antibody B57 as a diagnostic marker in melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol*, 26: 102, 2004.

KERR L. Atualização em ultra-sonografia de alta resolução – Valor do doppler colorido. In: Rosa JC, Romão LA. *Glândula Tireóide*. 2ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2001, 119-58.

KOBAYASHI T, LONCHAY C, COLAU D, DEMOTTE N, BOON T, van der BRUGGEN P. New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens*. Nov; 62(5): 426-32, 2003.

KONDO T, EZZAT S,. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. Apr; 6(4): 292-306, 2006.

KOPP P, KIMURA ET, AESCHIMANN S, OESTREICHER M, TOBLER A, FEY MF, STUDER H. Polyclonal and monoclonal thyroid nodules coexist within human multinodular goiters. *J Clin Endocrinol Metab*. Jul; 79(1): 134-9, 1994.

KRAUSE K, ESZLINGER M, GIMM O, KARGER S, ENGELHARDT C, DRALLE H, FUHRER D. TFF3 based candidate gene discrimination of benign and malignant thyroid tumours in a region with borderline iodine deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*., Jan 15; 2008.

KROHN K, FÜHRER D, HOLZAPFEL HP, PASCHKE R. Clonal origin of toxic thyroid nodules with constitutively activating thyrotropin receptor mutations. *J Clin Endocrinol Metab*., Jan; 83(1): 130-4, 1998.

LEOPOLD GR. Ultrasonography of superficially located structures. *Radiol Clin North Am.*, Apr; 18(1): 161-73, 1980.

LI M, YUAN YH, HAN Y, LIU YX, YAN L, WANG Y, GU J. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res*; 11: 1809-14, 2005.

LIM SH, BUMM K, CHIRIVA-INTERNATI M, XUE Y, WANG Z. MAGE-C1 (CT7) gene expression in multiple myeloma: relationship to sperm protein 17. *Eur J Haematol.*, Nov-Dec; 67(5-6): 332-4, 2001.

LIVOLSI VA, MERINO MJ. Worrisome histologic alterations following fine needle aspiration of the thyroid. *Pathol Annu*, 29: 99-120, 1994.

LOEVNER LA. Imaging of the thyroid gland. *Semin Ultrasound CT MRI* Dec; 17(6): 539-62, 1996.

LUCAS S, DE SMET C, ARDEN KC, VIARS CS, LETHÉ B, LURQUIN C, BOON T, Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res*, 58: 743-752, 1998.

LUO G, HUANG S, XIE X, STOCKERT E, CHEN YT, KUBUSCHOK B, PFREUNDSCHUH M. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun.*, Sep 19; 2: 11, 2002.

LURQUIN C, DE SMET C, BRASSEUR F, MUSCATELLI F, MARTELANGE V, De PLAEN E, BRASSEUR R, MONACO AP AND BOON T. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp.21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics*, 46: 397-408, 1997.

MAIO M, CORAL S, SIGALOTTI L, ELISEI R, ROMEI C, ROSSI G, CORTINI E, COLIZZI F, FENZI G, ALTOMONTE M, PINCHERA A, Vitale M. Analysis of cancer/testis antigens in sporadic medullary thyroid carcinoma: expression and humoral response to NY-ESO-1. *J Clin Endocrinol Metab*, Feb; 88(2): 748-54, 2003.

MARCHAND M, van BAREN N, WEYNANTS P, BRICHARD V, DRENO B, TESSIER MH, RANKIN E, PARMIANI G, ARIENTI F, HUMBLET Y, *et al.* Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*. Jan 18; 80(2): 219-30, 1999.

MARQUSEE E, BENSON CB, FRATES MC, DOUBILET PM, LARSEN PR, CIBAS ES, MANDEL SJ. Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. *Ann Intern Med*, Nov 7; 133(9): 696-700, 2000.

MAZZAFERRI EL, YOUNG RL. Papillary thyroid carcinoma: a ten-year follow-up report on the impact of treatment in 576 patients. *Am J Med*, Mar; 70(3): 511-8, 1981.

MAZZAFERRI EL. Treating differentiated thyroid carcinoma: where do we draw the line? *Mayo Clin Proc*, Jan; 66(1): 105-11, 1991.

MAZZAFERRI EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Méd*, 328: 553-559, 1993.

MCDUGALL IR, CAVALIERI RR. In Vivo Radionuclide Tests And Imaging. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2000, 224.

MEDEIROS-NETO GA. Bócio esporádico: mecanismo fisiopatológico e evolução. In: Medeiros - Neto G, Nicolau W. Temas atuais em tireoidologia. São Paulo: Editamed; 1977, 58-66.

MILKOVIC M, SARCEVIC B, GLAVAN E. Expression of MAGE tumor-associated antigen in thyroid carcinomas. *Endocr Pathol.* Spring; 17(1): 45-52, 2006.

MOLLAOGLU N, VAIRAKTARIS E, NKENKE E, NEUKAM FW, RIES J. Expression of MAGE-A12 in oral squamous cell carcinoma. *Dis Markers*; 24(1): 27-32, 2008.

MUEHLEISEN B, SCHAEERER L, DUMMER R, BURG G, HOFBAUER GF. Cancer/testis antigen MAGE-A4 expression pattern differs in epithelial skin tumors of organ-transplant recipients and immunocompetent patients. *J Cutan Pathol.*, Jan; 34(1): 1-6, 2007.

MUNN DH, ZHOU M, ATTWOOD JT, BONDAREV I, CONWAY SJ, MARSHALL B, BROWN C, MELLOR AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 281: 1191-1193, 1998.

NAIK KS, BURY RF. Imaging the thyroid. *Clin Radiol.*, Sep; 53(9): 630-8, 1998.

NAMBA H, MATSUO K, FAGIN JA. Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors. *J Clin Invest*, 86:120-125, 1990.  
NICOLAU W. Provas Laboratoriais in vitro. In: Rosa JC, Romão LA. Glândula Tireóide. 2ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2001, 81-90.

NONAKA D, TANG Y, CHIRIBOGA L, RIVERA M, GHOSSEIN R. Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol.*, Dec 14, 2007.

OLD LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.*, Mar 30;1: 1, 2001.

ORLANDI F, SAGGIORATO E, PIVANO G, PULIGHEDDU B, TERMINE A, CAPPIA S, DE GIULI P, ANGELI A. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res.*, Jul 15; 58(14): 3015-20, 1998.

ORTIZ R, HUPART KH, DE FESI CR, *et al.* Effect of early referral to an endocrinologist on efficiency and cost of evaluation and development of treatment plan in patients with thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*, Nov; 83(11): 3803-7, 1998.

PARMIGIANI RB, BETTONI F, VIBRANOVSKI MD, LOPES MH, MARTINS WK, CUNHA IW, SOARES FA, SIMPSON AJ, DE SOUZA SJ, CAMARGO AA. Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 28; 103(48): 18066-71, 2006.

PASIEKA JL, THOMPSON NW, MCLEOD MK, BURNEY RE, MACHA M. The incidence of bilateral well-differentiated thyroid cancer found at completion thyroidectomy. *World J Surg*, 16: 711-717, 1992.

PATEL A, STRAIGHT AM, MANN H, DUFFY E, FENTON C, DINAUER C, TUTTLE RM, FRANCIS GL. Matrix metalloproteinase (MMP) expression by differentiated thyroid carcinoma of children and adolescents. *J Endocrinol Invest*. May; 25(5):403-8, 2002.

PEIKERT T, SPECKS U, FARVER C, ERZURUM SC, COMHAIR SA. Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res.*, May 1; 66(9): 4693-700, 2006.

PETERSON S, SANGA A, EKLÖF H, BUNGA B, TAUBE A, GEBRE-MEDHIN M, ROSLING H. Classification of thyroid size by palpation and ultrasonography in field surveys. *Lancet*, 355(9198): 106-110, 2000.

PRASAD ML, JUNGBLUTH AA, PATEL SG, IVERSEN K, HOSHAW-WOODARD S, BUSAM KJ. Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck*, 26: 1053, 2004.

PRASAD ML, PELLEGATA NS, HUANG Y, NAGARAJA HN, DE LA CHAPELLE A, KLOOS RT. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol*, Jan;18(1): 48-57, 2005.

RASBACH DA, MONDSCHHEIN MS, HARRIS NL, KAUFMAN DS, WANG CA. Malignant lymphoma of the thyroid gland: a clinical and pathologic study of twenty cases. *Surgery*, Dec; 98(6): 1166-70, 1985.

RAY JM, STETLER-STEVENSON WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J.*, Nov 7(11): 2062-72, 1994.

RIES J, SCHULTZE-MOSGAU S, NEUKAM F, DIEBEL E, WILTFANG J. Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int J Oncol.*, Mar; 26(3): 817-24, 2005.

RIGOPOULOU D, MARTINEZ-LASO J, MARTINEZ-TELLO F, ALCAIDE JF, BENMAMAR D, HAWKINS F, ARNAIZ-VILLENA A. Both class I and class II HLA antigens are thyroid cancer susceptibility factors. *Tissue Antigens*. May; 43(5): 281-5, 1994.

RIMOLDI D, SALVI S, SCHULTZ-THATER E, SPAGNOLI GC, CEROTTINI JC. Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family. *Int J Cancer*. Jun 1; 86(5): 749-51, 2000.

ROSAI J, CARCANGIU ML, DeLELLIS RA. Tumors of the thyroid gland. In: Rosai J, Sobin LE, eds. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1992.

ROTI E, ROSSI R, TRASFORINI G, BERTELLI F, AMBROSIO MR, BUSUTTI L, PEARCE EN, BRAVERMAN LE, DEGLI UBERTI EC. Clinical and histological characteristics of papillary thyroid microcarcinoma: Results of a retrospective study in 243 patients. *J Clin Endocrinol Metab* Jun; 91(6): 2171-8, 2006.

RUSCHENBURG I, KUBITZ A, SCHLOTT T, KORABIOWSKA M, DROESE M. MAGE-1, GAGE-1/-2 gene expression in FNAB of classic variant of papillary thyroid carcinoma and papillary hyperplasia in nodular goiter. *Int J Mol Med.*, Oct; 4(4): 445-8, 1999.

SANDERS LE, CADY B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment *Arch Surg*, Apr; 133(4): 419-25, 1998.

SAVIN S, CVEJIC D, ISIC T, PETROVIC I, PAUNOVIC I, TATIC S, HAVELKA M. Thyroid peroxidase immunohistochemistry in differential diagnosis of thyroid tumors. *Endocr Pathol.*, Spring; 17(1): 53-60, 2006.

SAXÉN E, FRANSSILA K, BJARNASON O, NORMANN T, RINGERTZ N. Observer variation in histologic classification of thyroid cancer. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. Nov; 86A(6): 483-6, 1978.

SCANLAN MJ, GURE AO, JUNGBLUTH AA, OLD LJ, CHEN YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.*, Oct; 188: 22-32, 2002.

SCANLAN MJ, SIMPSON AJ, OLD LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.*, Jan 23; 4: 1, 2004.

SHAH JP, LOREE TR, DHARKER D, STRONG EW. Lobectomy versus total thyroidectomy for differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis. *Am J Surg*, 166: 331-335, 1993.

SHAHA A, LOREE TR, SHAH JP. Prognostic factors and risk group analysis in follicular carcinoma of the thyroid. *Surgery*, Dec; 118(6): 1131-6, 1995.

SHAHA A, SHAH JP, LOREE T. Patterns of Failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head Neck.*, 20: 26-30.40, 1998.

SHARMA P, SHEN Y, WEN S, BAJORIN DF, REUTER VE, OLD LJ, JUNGBLUTH AA. Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.*, Sep 15; 12(18): 5442-7, 2006.

SIGALOTTI L, FRATTA E, CORAL S, TANZARELLA S, DANIELLI R, COLIZZI F, FONSATTI E, TRAVERSARI C, ALTOMONTE M, MAIO M. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* Dec 15;64(24):9167-71, 2004.

SIMEONE JF, DANIELS GH, HALL DA, *et al.*: Sonography in the follow-up of 100 patients with thyroid carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, 148: 45-49, 1987.



SIMPSON AJ, CABALLERO OL, JUNGBLUTH A, CHEN YT, OLD LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. Aug; 5(8): 615-25, 2005.

SINGER PA, COOPER DS, DANIELS GH, LADENSON PW, GREENSPAN FS, LEVY EG, BRAVERMAN LE, CLARK OH, MCDOUGALL IR, AIN KV, DORFMAN SG. Treatment guidelines for patients with thyroid nodules and well-differentiated thyroid cancer. American Thyroid Association. *Arch Intern Med.*, Oct 28; 156(19): 2165-72, 1996.

SUSTER S. Thyroid tumors with a follicular growth pattern: problems in differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.*, Jul; 130(7): 984-8, 2006.

TAN GH, GHARIB H: Thyroid incidentalomas: Management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med*; 126: 226-231, 1997.

TAJIMA K, OBATA Y, TAMAKI H, YOSHIDA M, CHEN YT, SCANLAN MJ, OLD LJ, KUWANO H, TAKAHASHI T, TAKAHASHI T, MITSUDOMI T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer*. Oct; 42(1): 23-33, 2003.

TAYLOR BJ, REIMAN T, PITTMAN JA, KEATS JJ, DE BRUIJN DR, MANT MJ, BELCH AR, PILARSKI LM. SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *J Immunother* (1997). Nov-Dec; 28(6): 564-75, 2005.

TOMIMORI E, PEDRINOLA F, CAVALIERE H, KNOBEL M, MEDEIROS-NETO G. Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area. *Thyroid*. Aug 5(4): 273-6, 1995.

van BAREN N, BRASSEUR F, GODELAINE D, HAMES G, FERRANT A, LEHMANN F, ANDRÉ M, RAVOET C, DOYEN C, SPAGNOLI GC, BAKKUS M, THIELEMANS K, BOON T. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*. Aug 15; 94(4): 1156-64, 1999.

van HOEVEN KH, KOVATICH AJ, MIETTINEN M. Immunocytochemical evaluation of HBME-1, CA 19-9, and CD-15 (Leu-M1) in fine needle aspirates of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol*, 18: 93-97, 1998.

VENKATESH YS, ORDONEZ NG, SCHULTZ PN, HICKEY RC, GOEPFERT H, SAMAN NA. Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer*. Jul 15; 66(2): 321-30, 1990.

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.*; 90: 2512-2521, 2005.

YAMASHINA M. Follicular neoplasms of the thyroid. Total circumferential evaluation of the fibrous capsule. *Am J Surg Pathol.*, Apr; 16(4): 392-400, 1992.

ZENDMAN AJ, RUITER DJ, Van MUIJEN GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol.*, Mar; 194(3): 272-88, 2003.

ZHANG P, ZUO H, NAKAMURA Y, NAKAMURA M, WAKASA T, KAKUDO K. Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. *Pathol Int.*, May; 56(5): 240-5, 2006.

## **9. ANEXOS**

---

# ANEXO 1

## COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

[www.hcrp.fmrp.usp.br](http://www.hcrp.fmrp.usp.br)



Ribeirão Preto, 26 de março de 2008

Ofício nº 1099/2008  
CEP/SPC


Prezado Senhor,

O trabalho intitulado "CARACTERIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE GENES CODIFICANTES DE PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS EM PATOLOGIAS BENIGNAS E MALIGNAS DA GLÂNDULA TIREÓIDE", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 263ª Reunião Ordinária realizada em 24/03/2008, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 11167/2007.

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

  
**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador de Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor  
**DANIEL HARDY MELO**  
**PROF. DR. RUI CELSO MARTINS MAMEDE (Orientador)**  
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço  
Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço

## **10. ANEXO DE PUBLICAÇÃO**

---

---

**Genes codificantes de peptídeos específicos em doenças benignas e malignas da tireóide: análise por imuno-histoquímica.**

**Daniel hardy Melo<sup>1</sup>**  
**Rui Celso M Mamede<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pós-graduando em Nível de Mestrado do Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

<sup>2</sup>Professor Titular do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

**RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** Alguns tumores da tireóide apresentam características histológicas que dificultam a interpretação histopatológicas e os critérios diagnósticos usados, freqüentemente, são sutis e subjetivos. Assim, análises imuno-histoquímica e de biologia molecular têm sido utilizadas na tentativa de esclarecer o diagnóstico, mas ainda não alcançaram um nível de confiança para serem introduzidas na rotina dos laboratórios de Patologia. Por isso, impõe-se a necessidade de encontrar marcadores mais objetivos para, melhor que a morfologia clássica, caracterizar essas lesões. Dentre esse marcadores, a família MAGE, um grupo de peptídeos antigênicos de tumores apresentados por moléculas HLA classe I e reconhecidos por linfócitos T citotóxicos, expressa-se em cânceres de vários tipos histológicos. Entretanto, o seu papel nas doenças da tireóide é pouco investigado. A presente pesquisa tem a intenção de estudar se expressão das proteínas MAGE-A4 e MAGE-C1 podem colaborar (1) no diagnóstico diferencial das doenças foliculares benignas e malignas da glândula tireóide, (2) nas características histológicas do tumor e (3) nas curvas de sobrevida global.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Trata-se de estudo retrospectivo, caso-controle, com 70 casos operados no HCFMRP-USP, no período de 1991 a 2005 distribuídos em quatro grupos: 20 bóciolos adenomatosos, 10 adenomas foliculares, 16 carcinomas foliculares e 24 carcinomas papilíferos. Os critérios de inclusão foram: dados clínicos e macroscópicos disponíveis, representação adequada da lesão, processamento histológico apropriado e disponibilidade de blocos de parafina em boas condições. As análises dos dados clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímica dos biomarcadores MAGE-A4 e MAGE-C1 foram realizadas. **RESULTADOS:** No grupo de pacientes com doenças benignas, a proporção entre mulheres e homens foi de 9:1; a média de idade foi

de 42,9 anos com desvio padrão de 9,88 anos e mediana de 43 anos. Na avaliação clínica, podemos observar que o tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de  $3,0 \pm 1,53$  cm (1 a 8 cm). Vinte e um casos tinham tumores localizados no lobo D e nove casos no lobo E da glândula tireóide. Ao considerar a casuística para as doenças malignas, a distribuição segundo o gênero revelou que 85% dos pacientes eram do sexo feminino, com proporção entre mulheres e homens de 8,5:1,5. A média de idade foi de 48,45 anos com desvio padrão de 17,0 anos e mediana de 48 anos. Na avaliação clínica, tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de  $3,63 \pm 1,73$ cm (0,6 a 8cm). No grupo com carcinoma folicular, a localização do tumor foi predominantemente no lobo direito em relação ao lobo esquerdo (1,5:1). Entre os casos de carcinoma papilífero, a localização do tumor foi, em 25 casos, no lobo esquerdo e em 15, no lobo direito. A invasão angiolímfática foi observada em 37,5% dos pacientes com carcinomas foliculares e 50% com carcinoma papilífero. Não foi observada imunomarcagem dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 de qualquer grau de intensidade em nenhuma das amostras. **DISCUSSÃO:** A degeneração maligna de tecidos é um processo multifatorial, nos quais estão envolvidos elementos genéticos e ambientais em proporções variáveis, nos diversos tipos de tumores e de indivíduos. Esse fato, acreditamos, explica a ausência de expressão dos genes aqui estudados. **CONCLUSÃO:** Não houve expressão dos antídotos analisados.

**Palavras Chave:** Nódulo da Glândula Tireóide, Neoplasias da Glândula Tireóide, Marcadores Biológicos de Tumor, Imuno-histoquímica.



## **SUMMARY**

**INTRODUCTION:** A subset of thyroid tumors characterized by a follicular growth pattern can represent a serious challenge for diagnosis because the histologic features and diagnostic criteria used for distinguishing among these conditions can often be subtle and subjective. Immunohistochemistry and molecular pathology for genetic profiling have been utilized in an attempt to resolve some of these issues but have not yet succeeded in attaining a level of reliability or practicality that could be translated into the routine practice of surgical pathology. MAGE gene family encodes tumor-specific antigens that are recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes. In cancers, these genes are re-activated and their encoding proteins are frequently expressed in various histological types of cancers. There is, however, little information on their expression in thyroid tumors. This study was proposed to verify the expression of the MAGE-A4 and MAGE-C1 antigens in human thyroid tumors, and to explore the potential implications regarding diagnosis and therapy using MAGE peptides.

**MATERIALS AND METHODS:** It was performed a retrospective case-control study involving 70 patients who underwent surgical therapy at the Ribeirao Preto Medical School Hospital, between January 1991 and December 2005. According to the histological type of thyroid neoplasm, 70 patients in our study were divided into four groups: 20 adenomatous goiters, 10 follicular adenomas, 24 papillary carcinomas, 16 follicular carcinomas. Inclusion criteria were: clinical data and optimum histological preparation available. All data including age, gender, localization, size of tumor, lymphatic infiltration and outcome were obtained from the clinical-pathologic records. The search of immunohistochemical analysis with MAGE-A4 and MAGE-C1 antibodies was done. **RESULTS:** Among the patients with benign pathologies, the

ratio between female versus male were 9:1; the mean age was 42,9 years with standard deviation of 9,88 years and the median was 43 years. On the clinical evaluation we can observe that the nodule size considering the major diameter had mean of  $3,0 \pm 1,53$  cm (1 to 8 cm). Twenty one cases had tumors on the right lobe and nine cases on the left lobe of the thyroid gland. The ratio between the left and right lobe for the follicular adenoma was 6:1. Considering the malignant disease distribution by the sex, we observed that 85% of the patients were female, with a ratio between male and female of 8,5:1,5. The mean of age was 48,45 years with standard deviation of 17,0 years and the median was 48 years. On the clinical evaluation we can observe that the nodule size considering the major diameter had mean of  $3,63 \pm 1,73$  cm (0,6 to 8 cm). Tumor localization was predominantly in the right lobe in follicular carcinoma (the ratio between the right and left lobe was 1,5:1) and predominantly in the left lobe in papillary carcinoma (the ratio between the left and right lobe was 1,67:1). Lymphatic infiltration was observed in 37.5% in follicular carcinoma and 50% in papillary carcinoma. Among the antigens examined, MAGE-A4 and MAGE-C1, were not expressed in any of the tissues. **CONCLUSION:** The malignant degeneration of normal tissues is a multifactorial process in which both genetic host and environmental elements contribute to produce cancer, and vary considerably both among tumor types and among individual patients. We believe that this fact explains the absence of immunohistochemical expression of antigens studied here.

**Key words:** Thyroid Nodule, Thyroid Neoplasms, Biological Tumor Markers, Immunohistochemistry.

---

---

## INTRODUÇÃO

Nódulo solitário é encontrado em 1,5% dos homens e 6,4% das mulheres, no entanto, quando se faz uso de USG, a prevalência de nódulos passa a ser de 20 a 70% em estudos clínicos e se o estudo for com material de autópsia, sua presença chega a 50% [1-3]. A importância de estudar esses nódulos se apóia na necessidade de excluir o câncer de tireóide, presente em até 10% dos achados, além de evitar intervenção cirúrgica desnecessária para nódulos benignos [4]. Assim, é fundamental que se faça a distinção entre lesões benignas e malignas e, se possível, que se estabeleça o grau de agressividade do tumor antes do ato cirúrgico. Nesse sentido, tentativas têm sido feitas para que, através da PAAF (punção aspirativa com agulha fina), quer com RT-PCR, imuno-histoquímica, colorações especiais e estudos biomoleculares, se obtenham essas informações, porém, até hoje elas não são confiáveis [5]. Por isso, necessária se faz a procura por novas técnicas que favoreçam essa identificação.

Antígenos tumorais específicos (CTA) são predominantemente expressos em células testiculares normais, como também em diferentes tipos histológicos de cânceres [6-8]. Por causa do padrão de expressão específico nos tecidos neoplásicos, os antígenos tumorais específicos são considerados alvos ideais para imunoterapia [6,9]. O gene MAGE-A4 apresenta dois alelos que codificam as proteínas MAGE-A4a e MAGE-A4b, essas diferindo em apenas um aminoácido [10]. Em cabeça e pescoço, o MAGE-A4 foi identificado em 53% dos casos por RT-PCR, porém a sua expressão, ainda não foi avaliada por imuno-histoquímica (anticorpo 57B) [11]. O MAGE-C1 é outro membro da família MAGE conhecido como CT7 e em cabeça e pescoço expressou-se em 9,5% dos casos analisados por RT-PCR [12].

O presente estudo em doenças foliculares benignas e malignas da glândula

---

---

tireóide, visou analisar a expressão imuno-histoquímica dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Utilizaram-se 70 casos operados, sendo 20 bócios colóides, 10 adenomas foliculares, 16 carcinomas foliculares e 24 carcinomas papilíferos. Os critérios de inclusão foram: dados clínicos e macroscópicos disponíveis (idade e sexo do paciente, tamanho do nódulo, multicentricidade, invasões vascular e capsular, extensão extraglandular, presença de metástases ganglionares e hematogênicas); representação adequada da lesão; processamento histológico apropriado e disponibilidade de blocos de parafina em boas condições. Para o grupo-controle, selecionaram-se 10 casos de necrópsias com tecido tireóideo sem doenças.

As peças cirúrgicas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por um período não superior a 48 horas, clivadas e obtidas áreas representativas da neoplasia, que foram, então, emblocadas em parafina para obtenção dos cortes histológicos de 4µm de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Os anticorpos utilizados para as reações imuno-histoquímicas foram: MAGE-A4 (57B, 1:4.000 em tampão EDTA 1mM, pH 8,0 – Ludwig Institute, NY) e MAGE-C1 (CT 7-33, 1:32.000, solução de ácido cítrico 10mM, pH 6,0 – Ludwig Institute, NY).

Para evitar reação endógena devido à presença de biotina e avidina, foram utilizados polímero dextran e sistema de amplificação enzimática NovoLink (Novocastra, UK). Resumidamente, cortes teciduais de 4µm foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor por três minutos em steamer, com solução de ácido cítrico 10mM/pH 6.0. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução

---

aquosa de peróxido de hidrogênio a 6%. A incubação com o anticorpo primário foi feita a 37°C em câmara úmida a 4°C por 12 horas (overnight). A incubação com anticorpo secundário, diluído em PBS, foi realizada por 30 minutos a 37°C. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados por 30 minutos a 37°C com o sistema amplificador Novolink. Por fim, os cortes histológicos foram lavados em água corrente por 10 minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, novamente lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi realizada em resina Permount (Fisher Scientific®, Fair Lawn, NJ/USA, cód. S15-100). As leituras foram realizadas em microscópio de múltipla observação, por dois observadores independentes, patologistas cirúrgicos com experiência na área, com desconhecimento da identidade dos casos e definidas mediante consenso. As reações foram classificadas subjetivamente quanto à extensão da imunomarcação em: **Zero**: até 5% das células neoplásicas marcadas; **1+**: 5 – 25%; **2+**: 25 – 50%; **3+**: 50 – 75% e **4+**: > 75% das células neoplásicas marcadas.

Para fins de análise estatística foi considerada imunomarcação positiva quando mais de 50% das células neoplásicas foram marcadas (classificação 3+ e 4+).

Foi utilizado um sistema digital de aquisição de imagens da marca ZEISS composto de microscópio Axioskop 2 plus, câmera digital AxioCam HRc e o programa Axiovision 4.6.3. Para rodar o programa e guardar as imagens foi utilizado um computador Satélite® INT modelo Pentium 4 intel®.

Os resultados foram expressos como valores médios (idade dos pacientes e tamanhos dos nódulos), porcentagem ou números absolutos. Tabelas de contingência foram elaboradas para testar a associação entre as variáveis qualitativas. O teste do Chi-quadrado (Pearson) foi utilizado na análise estatística dos resultados. Para as variáveis

---

quantitativas (idade e diâmetro do nódulo) foi empregada a técnica de análise de variância (ANOVA - Analysis of Variance), para a comparação das médias. A estatística do teste foi a F-Fisher. Dois valores foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$

## RESULTADOS

De acordo com a classificação histológica das doenças avaliadas, os 70 pacientes participantes do estudo foram divididos em dois grupos: com doenças benignas e malignas.

No grupo dos tumores benignos foram observados os seguintes dados clínicos: idade, sexo, localização do nódulo, tamanho em centímetros observado à macroscopia, doença e expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 (Tabela 1).

A distribuição, segundo o sexo, revelou que 90% dos pacientes com doenças foliculares benignas eram mulheres, com proporção entre mulheres e homens de 9:1. A média de idade nesse grupo foi de 42,9 anos com desvio padrão de 9,88 anos e mediana de 43 anos. Os nódulos em função do maior diâmetro obtiveram média de  $3,0 \pm 1,53$ cm (1 a 8cm). Vinte e um casos tinham tumores localizados no lobo D da glândula tireóide e nove no lobo E. Não foi detectada imunomarcagem dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1, em tecido tireóideo normal, bem como no grupo dos tumores benignos. Nas Figuras 3 e 4 são mostradas as reações de imunomarcagem em amostras de bócio colóide e adenoma folicular, respectivamente (Figuras 1 e 2).

Para os grupos com carcinomas papilífero e folicular foram observados parâmetros clínicos e patológicos: idade, sexo, localização, tamanho do tumor (cm)

---

---

observado à macroscopia, doença, infiltração angiolímfática e expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 (Tabela 2).

Cerca de 85% dos pacientes com doenças foliculares malignas eram mulheres, com proporção entre mulheres e homens de 8,5:1,5. A média de idade para essa doença foi de 48,45 anos com desvio padrão de 17,0 anos e mediana de 48 anos. O tamanho dos nódulos em função do maior diâmetro obteve média de  $3,63 \pm 1,73$ cm (0,6 a 8cm). No grupo com carcinoma folicular, a localização do tumor foi predominantemente no lobo direito em relação ao lobo esquerdo (1,5:1). Entre os casos de carcinoma papilífero, a localização do tumor foi, em 25 casos, no lobo esquerdo e em 15 no lobo direito. A invasão angiolímfática foi observada em 37,5% dos pacientes com carcinomas foliculares e 50% dos pacientes com carcinoma papilífero.

Para os tumores malignos, o estudo da expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 foi negativa no método utilizado. A expressão dos anticorpos monoclonais 57B e CT7-33 dessas amostras está demonstrada na Figuras 3 e 4. Nem mesmo nos casos avançados com invasão angiolímfática, foram observadas imunomarcação positiva.

Entre as amostras foliculares benignas, não houve associação entre essas doenças e a imunomarcação dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1.

No grupo de amostras de doenças foliculares malignas, também não foi possível observar-se associação entre as doenças e a imunomarcação dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1. Da mesma forma, não foi possível correlacionar essas características com os dados clínicos e macroscópicos coletados (idade e sexo do paciente, tamanho do nódulo, multicentricidade, invasão vascular e capsular, extensão extraglandular,

presença de metástases ganglionares e hematogênicas), portanto sem significância estatística.

## **DISCUSSÃO**

Os tumores da tireóide, caracterizados por crescimento a partir das células foliculares, constituem as mais freqüentes lesões encontradas pelos patologistas, representando desafios na interpretação histopatológica. Como tumores de tireóide de padrão folicular, incluem-se desde lesões benignas (bócios adenomatosos, adenoma folicular) até lesões malignas (carcinoma folicular). Além desses, outros tipos de tumores tireóideos pertencentes a categorias diferentes podem se apresentar histologicamente com padrão folicular, como o carcinoma papilífero variante folicular e o carcinoma medular. As características histológicas e os critérios diagnósticos usados para distinguir entre essas lesões freqüentemente são sutis e subjetivas [13-15]. Análises através da imuno-histoquímica e estudos em biologia molecular têm sido utilizadas na tentativa de esclarecer o diagnóstico, mas ainda não alcançaram um nível de confiança aceitável para serem introduzidas na rotina dos laboratórios de Patologia [16, 17].

Em virtude do padrão de expressão, os CTAs têm merecido atenção como potenciais alvos na imunoterapia dos tumores [18]. No entanto, para as neoplasias da tireóide, Ruschenburg *et al* (1999) demonstraram a utilidade da expressão dos antígenos MAGE-A1 e GAGE-1/2 detectados na PAAF, através de RT-PCR, no carcinoma papilífero, facilitando o diagnóstico de nódulos tireóideos ao eliminar as armadilhas da diferenciação citológica entre esse carcinoma e o bócio adenomatoso. Na avaliação de 30 casos estudados, não foram observadas expressões dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 nas doenças benignas e, não foi possível, a partir dos resultados,



---

correlacionar os marcadores com os dados clínicos e macroscópicos disponíveis (idade, sexo e tamanho do nódulo).

Em relação às neoplasias malignas da glândula tireóide, havia poucos relatos sobre a expressão das proteínas CTAs e, principalmente, da família MAGE [5,19,20]. A expressão das proteínas codificadas pelo MAGE-A4 e pelo MAGE-C1 não havia sido investigada e, essa é a primeira descrição em neoplasias foliculares malignas da tireóide. Da mesma maneira que se observou com as doenças benignas, não se detectou expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 nos 40 casos de doenças malignas, inclusive naquelas com evidências clínicas e anatomopatológicas de agressividade (invasão angiolinfática). Dessa forma, não foi possível, correlacionar os marcadores com os dados clínicos e histopatológicos disponíveis (idade, sexo, tamanho do nódulo, multicentricidade, invasões vascular e capsular, extensão extraglandular, presença de metástases ganglionares e hematogênicas). Em nosso estudo, a diferenciação entre benigno e maligno, através da presença do MAGE-A4 e MAGE-C1, não se mostrou possível.

A expressão constatada por Iwamoto *et al* (1997), Prasad *et al* (2004) e Ries *et al* (2005) para o MAGE-A4 em câncer de cabeça e pescoço, não foi detectada neste estudo, porque esse antígeno não está expresso na glândula tireóide, como sugeria Maio *et al* (2003) ao estudá-lo em carcinoma medular da tireóide. O mesmo se pode dizer a respeito do gene MAGE-C1, que também não foi expresso em nossa amostra, como sugeria Jungbluth *et al* (2002) ao obterem expressão fraca em CEC de cabeça e pescoço. Os mecanismos envolvidos na patogênese tumoral são obscuros e, ainda, em fase de experimentação, mas a degeneração maligna dos tecidos é um processo específico para cada tecido, dele participando diferentes genes em complexas cadeias de sucessivas

---

alterações. Pelos resultados aqui observados, é possível que os MAGEs não tenham função na gênese dos tumores benignos e malignos da tireóide.

A degeneração maligna dos tecidos é um processo multifatorial, nos quais estão envolvidos elementos genéticos e ambientais, cuja contribuição varia, consideravelmente entre raças, entre diferentes tipos de tumores e até de indivíduo para indivíduo. Tajima *et al*, em 2003, demonstraram esse fato, ao detectarem que as expressões do NY-ESO-1 em carcinoma de pulmão diferiam significativamente entre japoneses e caucasianos. Os antígenos HLA têm sido relacionados como fatores genéticos que influenciam o desenvolvimento (positiva ou negativamente) dos tumores. A família dos antígenos MAGE codifica um grupo de peptídeos antigênicos apresentados por moléculas HLA classe I e reconhecidos por linfócitos T. Rigopoulou *et al* (1994) analisaram a presença de antígenos HLA classe I (-A, -B, -C) e HLA classe II (-DR, -DQ) em câncer de tireóide, cuja frequência era razão de controvérsia entre os estudos. Observaram em ambas, classe I e classe II, fatores de susceptibilidade para o carcinoma papilífero e que a sua presença variava conforme as populações investigadas. Esses autores constataram que entre os espanhóis, os subtipos B35 e DR11 foram os mais frequentes, à semelhança com a população do norte da África, não arábicos, e diferentes dos italianos (B35 e DR1), americanos (DR7) e dos alemães. Nestes últimos (alemães) detectou-se o predomínio de 3 subtipos (B62, DR5 e DR6). Da mesma forma, Kobayashi *et al* (2003) divulgaram a descoberta de um novo peptídeo antigênico MAGE-A4 (alelo a) apresentado por moléculas HLA-A1, expressas em diferentes grupos étnicos: negros (9%), caucasóides (26%), orientais (7%) e ameríndios (11%).

Tais observações nos conduzem a algumas reflexões: (1) fatores ambientais (geográficos) influenciariam a estrutura genética das moléculas HLA nos tumores,

assim como (2) fatores étnicos e/ou genéticos. Além dessas, são sugeridos (3) cofatores como vírus, tabaco, bebida alcoólica, radiação ultravioleta, radiação ionizante intensificando a ação dos fatores genéticos HLA a induzir câncer. A influência dos fatores ambientais e genéticos devem ser os principais responsáveis pela patogênese dos tumores, levando à (1) participação de genes fora do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) nas etapas do processo, (2) a estímulos diferentes sobre as moléculas HLA classe I ou classe II gerando diferentemente resposta celular ou humoral e, ainda (3) determinar respostas imunológicas diferentes podendo gerar a presença de um dos dois alelos para o MAGE-A4 [25]. Isso sugere que o fato dos genes MAGE-A4 e C1 não terem sido expressos na população estudada não significa que em outras não possam ser.

Os avanços no conhecimento da moderna biologia molecular nas doenças tireóideas poderão identificar marcadores que possibilitem uma acurada caracterização dos tipos e subtipos de doenças benignas e malignas, em amostras histológicas e células obtidas a partir da PAAF. Os CTAs, genes promissores para esta função, são expressos em pequenos grupos de tumores humanos e em alguns casos deve-se procurar identificar outros CTAs devido aos fenômenos a que estão sujeitos, ou seja a heterogeneidade, co-expressão e interação entre genes. A presença da heterogeneidade sugere o desenvolvimento de vacinas polivalentes contendo epítopos de dezenas de antígenos codificados por esses genes [27], porém a co-expressão e a interação entre genes poderão restringir esse número para 6 a 10 anticorpos [28].

Enquanto a incidência de muitas neoplasias malignas da região da cabeça e pescoço encontra-se em declínio, os cânceres da tireóide, como tem sido demonstrado, apresentam aumento [29]. Embora a incidência aumentada de doenças malignas da

tireóide possa se relacionar à detecção dos nódulos com a popularização do ultra-som, a combinação de detecção precoce e a probabilidade de diagnóstico de câncer em alterações aparentemente pouco importantes, reforçam a necessidade de métodos não cirúrgicos para a diferenciação de doenças benignas e malignas e a indicação dos cânceres de alto risco para recidiva e metástase.

## **CONCLUSÕES**

O presente estudo em doenças foliculares benignas e malignas da glândula tireóide, mostrou que não houve imunomarcção dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Mazzaferri EL: Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med*, 328: 553-559, 1993.
2. Burch HB: Evaluation and management of the solid thyroid nodule. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 24: 663-710, 1995.
3. Tan GH, Gharib H: Thyroid incidentalomas: Management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med*; 126: 226-231, 1997
4. Singer PA, Cooper DS, Daniels GH, Ladenson PW, Greenspan FS, Levy EG, Braverman LE, Clark OH, McDougall IR, Ain KV, Dorfman SG. Treatment guidelines for patients with thyroid nodules and well-differentiated thyroid cancer. American Thyroid Association. *Arch Intern Med.*, Oct 28; 156(19): 2165-72, 1996.

- 
5. Ruschenburg I, Kubitz A, Schlott T, Korabiowska M, Droese M. MAGE-1, GAGE-1/-2 gene expression in FNAB of classic variant of papillary thyroid carcinoma and papillary hyperplasia in nodular goiter. *Int J Mol Med.*, Oct; 4(4): 445-8, 1999.
  6. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2002, Oct; 188: 22-32, 2002.
  7. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.*, Jan 23; 4:1, 2004.
  8. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer.* Aug; 5(8): 615-25, 2005.
  9. Bodey B Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.*, Aug; 2(6): 577-84, 2002.
  10. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Bresseur F, van der Bruggen P, Lethé B, Lurquin C *et al.* Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40(5): 360-9, 1994.
  11. Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol.*, Oct; 29(10): 3329-37, 1999.
  12. Chen YT, Güre AO, Tsang S, Stockert E, Jäger E, Knuth A, Old LJ. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jun 9; 95(12): 6919-23, 1998.

- 
13. Hirokawa M, Carney JA, Goellner JR, DeLellis RA, Heffess CS, Katoh R, Tsujimoto M, Kakudo K. Observer variation of encapsulated follicular lesions of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol.*, Nov; 26(11): 1508-14, 2002.
  14. LiVolsi VA, Merino MJ. Worrisome histologic alterations following fine needle aspiration of the thyroid. *Pathol Annu*, 29: 99-120, 1994.
  15. Suster S. Thyroid tumors with a follicular growth pattern: problems in differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.*, Jul; 130(7): 984-8, 2006.
  16. Cerilli LA, Mills SE, Rumpel CA, Dudley TH, Moskaluk CA. Interpretation of RET immunostaining in follicular lesions of the thyroid. *Am J Clin Pathol.*; 118: 186-193, 2002
  17. 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.*; 90: 2512-2521, 2005.
  18. Boon T, Old LJ. Cancer tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, 9: 681-3, 1997.
  19. Maio M, Coral S, Sigalotti L, Elisei R, Romei C, Rossi G, Cortini E, Colizzi F, Fenzi G, Altomonte M, Pinchera A, Vitale M. Analysis of cancer/testis antigens in sporadic medullary thyroid carcinoma: expression and humoral response to NY-ESO-1. *J Clin Endocrinol Metab*, Feb; 88(2): 748-54, 2003.
  20. Milkovic M, Sarcevic B, Glavan E. Expression of MAGE tumor-associated antigen in thyroid carcinomas. *Endocr Pathol.* Spring; 17(1): 45-52, 2006.
  21. Iwamoto O, Nagao Y, Shichijo S, Eura M, Kameyama T, Itoh K. Detection of MAGE-4 protein in sera of patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer.* Jan 27; 70(3): 287-90, 1997.

- 
22. Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ. Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck*, 26: 1053, 2004.
  23. Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J. Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int J Oncol*, Mar; 26(3): 817-24, 2005.
  24. Jungbluth AA, Chen YT, Busam KJ, Coplan K, Kolb D, Iversen K, Williamson B, Van Landeghem FK, Stockert E, Old LJ. CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues. *Int J Cancer*. Jun 20; 99(6): 839-45, 2002.
  25. Rigopoulou D, Martinez-Laso J, Martinez-Tello F, Alcaide JF, Benmamar D, Hawkins F, Arnaiz-Villena A. Both class I and class II HLA antigens are thyroid cancer susceptibility factors. *Tissue Antigens*. May; 43(5): 281-5, 1994.
  26. Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P. New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens*. Nov; 62(5): 426-32, 2003.
  27. Gombos K, Zele E, Kiss I, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Kovács E, Szanyi I, Ember I. Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. *Cancer Genomics Proteomics*. Nov-Dec; 4(6): 403-9, 2007.
  28. Krause K, Eszlinger M, Gimm O, Karger S, Engelhardt C, Dralle H, Fuhrer D. TFF3 based candidate gene discrimination of benign and malignant thyroid tumours in a region with borderline iodine deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.*, Jan 15; 2008.

29. Shaha A, Shah JP, Loree T. Patterns of Failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head Neck*. 20: 26-30.40, 1998.
30. Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, Old LJ, Kuwano H, Takahashi T, Takahashi T, Mitsudomi T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer*. Oct; 42(1): 23-33, 2003.



---

---

## LEGENDAS DE FIGURAS

**Figura 1** - Microfotografia de amostra de testículo com imunomarcção do antígeno MAGE-A4 pela expressão do anticorpo monoclonal 57B (100x). **(A)** Controle positivo. **(B)** Controle negativo.

**Figura 2** - Microfotografia de amostra de testículo com imunomarcção do antígeno MAGE-C1 pela expressão do anticorpo monoclonal CT7-33 (100x). **(A)** Controle positivo. **(B)** Controle negativo.

**Figura 3** - Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em bócio colóide. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de bócio colóide (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de bócio colóide com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de bócio colóide com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x).

**Figura 4** - Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em adenoma folicular. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de adenoma folicular (H&E 50x). **(C)** Microfotografia de amostra de adenoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de bócio colóide com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x)

**Figura 5** - Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em carcinoma folicular. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de carcinoma folicular com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x)

**Figura 6** - Microfotografia de amostras com imunomarcção dos antígenos em carcinoma papilífero. **(A)** Microfotografia de amostra de glândula tireóide normal (H&E, 100x). **(B)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero (H&E 100x). **(C)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero com imunomarcção negativa para MAGE-A4 (100x). **(D)** Microfotografia de amostra de carcinoma papilífero com imunomarcção negativa para MAGE-C1 (100x)

Figura 1

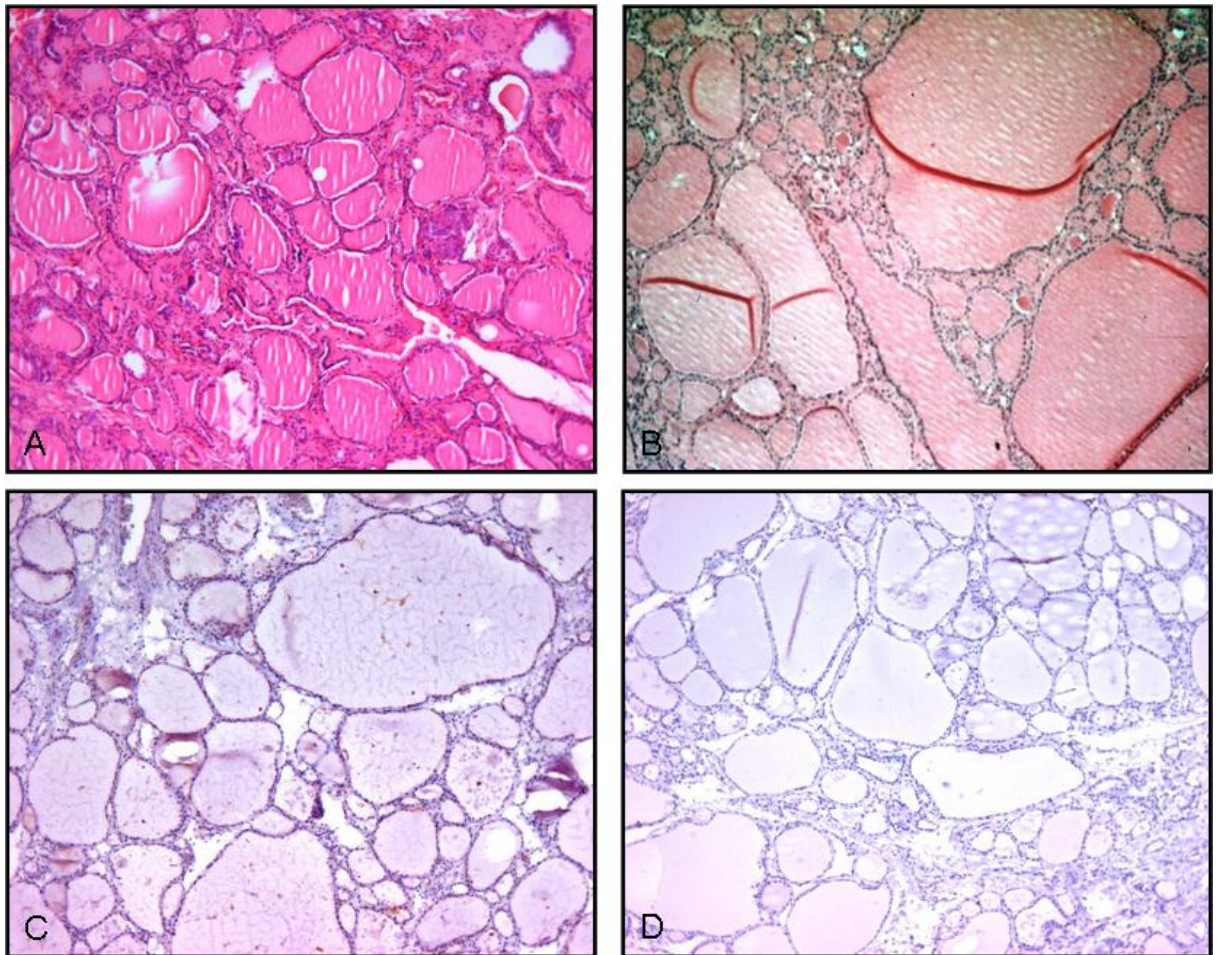


Figura 2

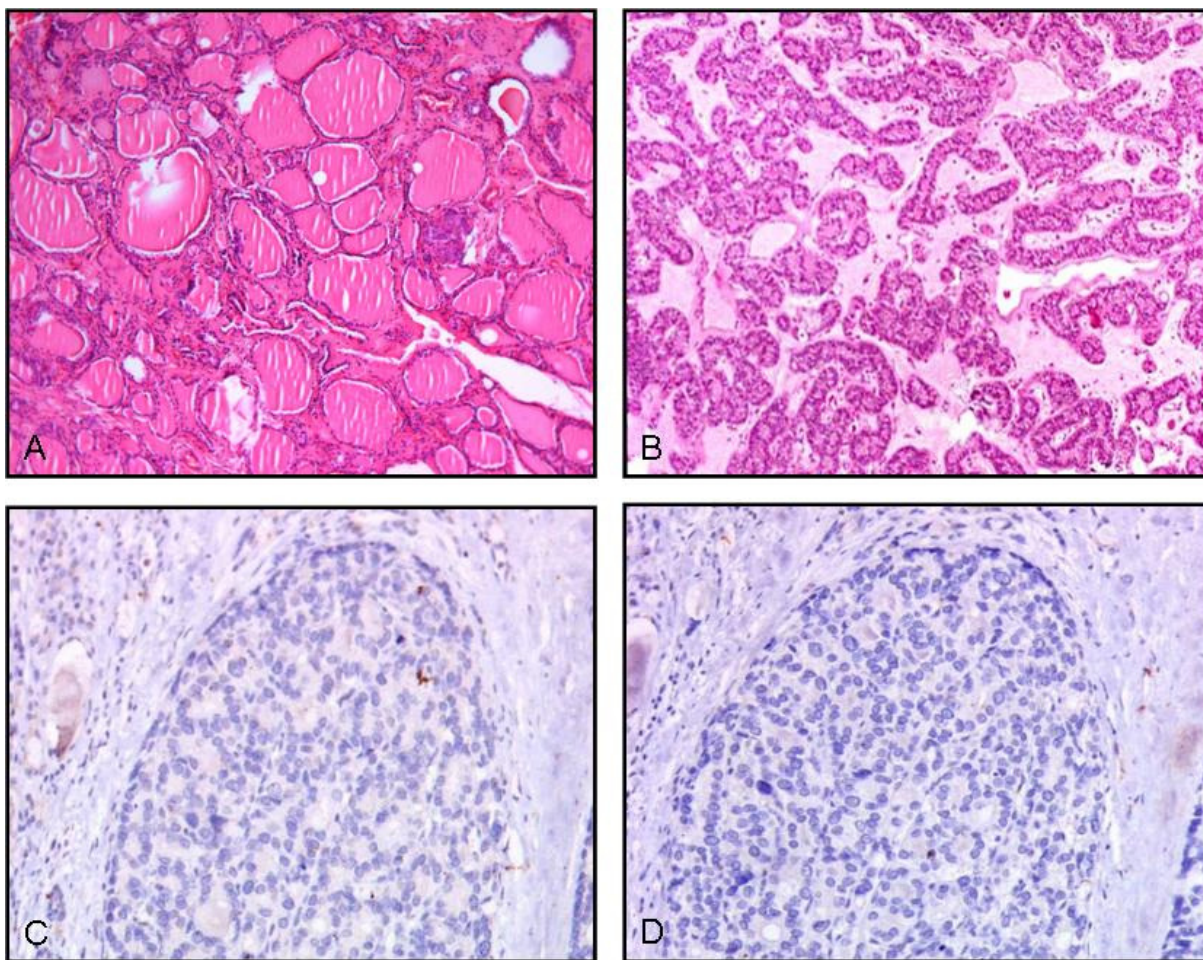


Figura 3

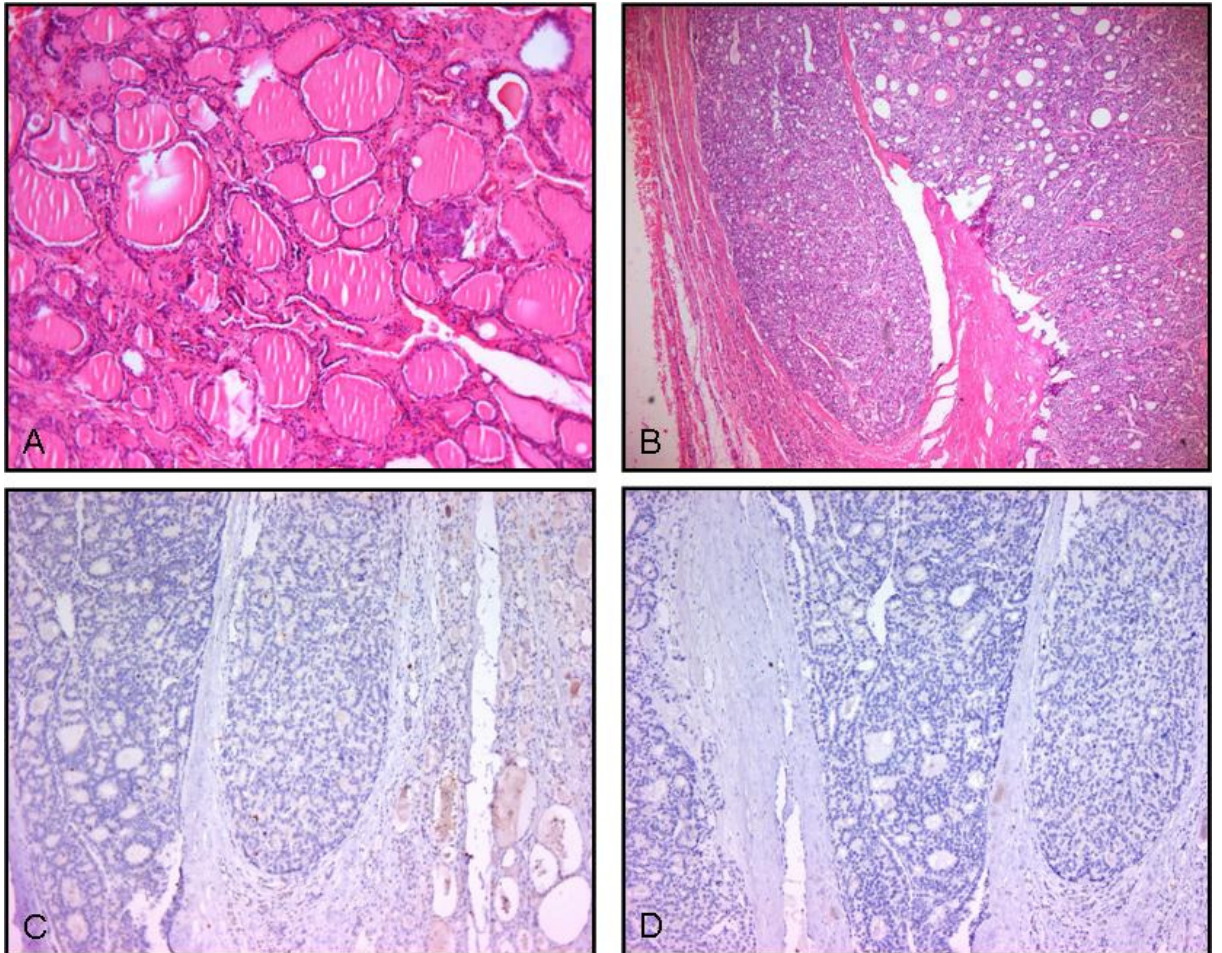
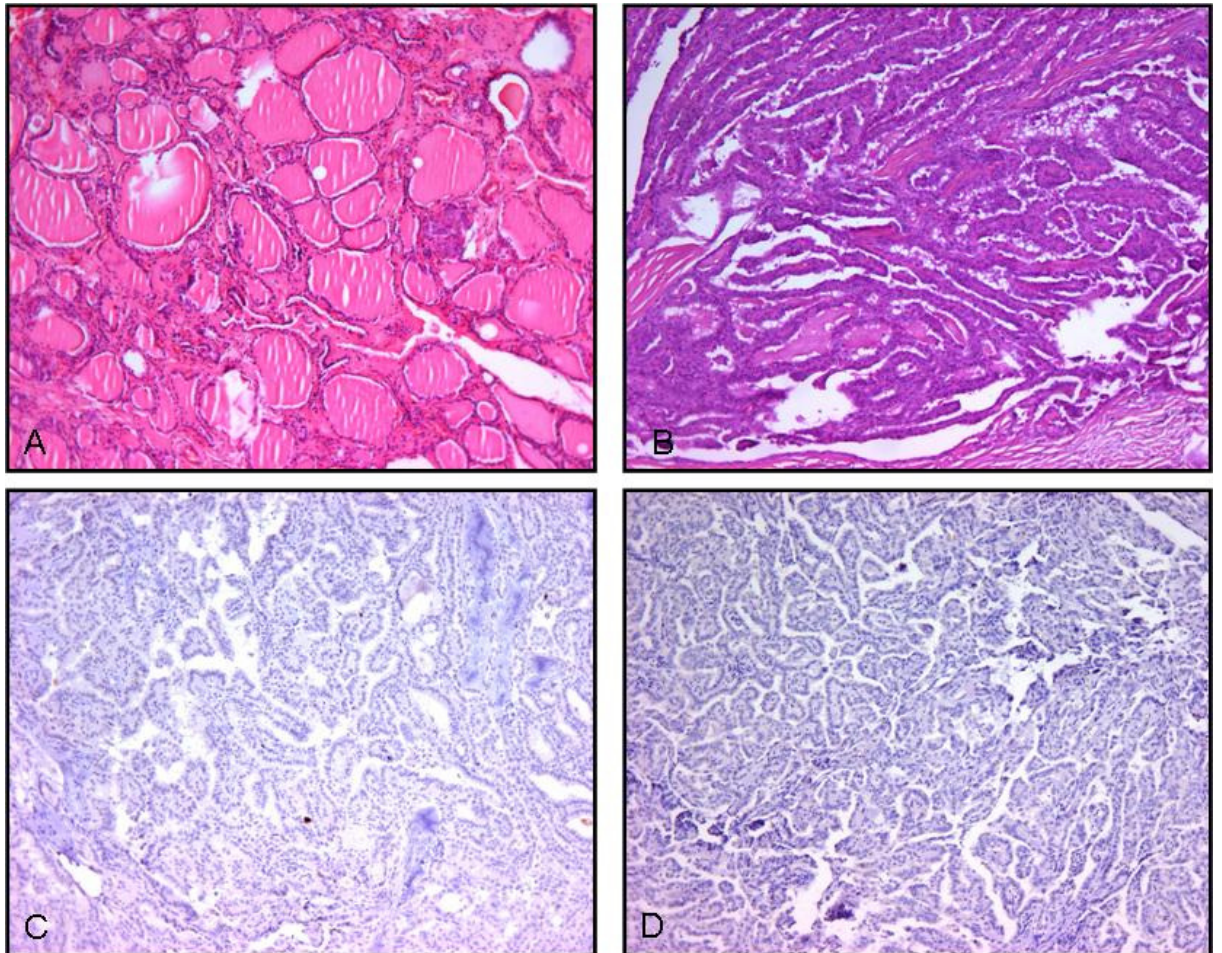


Figura 4



**Tabela 1.** Características demográficas, tumorais e sua relação com a expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 em doenças benignas.

Paciente	Idade	Sexo	Localização	Tamanho	Doença	MAGE-A4	MAGE-C1
1	18	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
2	39	F	Lobo D	1,0	Bócio	-	-
3	58	F	Lobo E	1,5	Adenoma	-	-
4	60	F	Lobo D	3,0	Bócio	-	-
5	29	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
6	43	F	Lobo D	1,0	Bócio	-	-
7	48	M	Lobo E	2,5	Bócio	-	-
8	32	F	Lobo E	1,0	Adenoma	-	-
9	51	F	Lobo D	2,0	Adenoma	-	-
10	45	F	Lobo D	4,0	Bócio	-	-
11	42	F	Lobo E	5,0	Bócio	-	-
12	46	F	Lobo D	3,0	Adenoma	-	-
13	53	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
14	28	F	Lobo E	4,0	Bócio	-	-
15	49	F	Lobo D	2,5	Bócio	-	-
16	25	F	Lobo E	4,0	Adenoma	-	-
17	56	M	Lobo D	3,0	Bócio	-	-
18	31	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
19	38	F	Lobo E	1,5	Adenoma	-	-
20	42	F	Lobo D	2,7	Bócio	-	-
21	36	F	Lobo D	8,0	Adenoma	-	-
22	55	F	Lobo D	5,0	Bócio	-	-
23	43	F	Lobo D	5,0	Bócio	-	-
24	51	F	Lobo D	3,5	Adenoma	-	-
25	42	F	Lobo E	3,0	Bócio	-	-
26	39	F	Lobo D	2,5	Adenoma	-	-
27	43	F	Lobo D	2,0	Bócio	-	-
28	50	M	Lobo D	3,5	Bócio	-	-
29	36	F	Lobo E	3,0	Bócio	-	-
30	38	F	Lobo D	5,0	Adenoma	-	-

**Tabela 2.** Características demográficas, tumorais e sua relação com a expressão dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 com doenças malignas.

Paciente	Idade	Sexo	Localização	Tamanho	Doença	Infiltração angiolímfática	MAGE- A4	MAGE- C1
1	51	F	Lobo D	4,5	Folicular	-	-	-
2	39	F	Lobo D	5,8	Folicular	-	-	-
3	28	F	Lobo E	1,7	Folicular	+	-	-
4	71	F	Lobo E	2,5	Folicular	-	-	-
5	37	F	Lobo D	1,8	Folicular	+	-	-
6	55	M	Lobo E	5,0	Folicular	+	-	-
7	43	F	Lobo D	8,0	Folicular	-	-	-
8	48	M	Lobo D	2,5	Folicular	+	-	-
9	49	F	Lobo E	3,5	Folicular	+	-	-
10	45	F	Lobo D	6,0	Folicular	-	-	-
11	64	M	Lobo D	4,0	Folicular	+	-	-
12	42	F	Lobo E	3,0	Folicular	-	-	-
13	71	F	Lobo D	2,5	Folicular	-	-	-
14	53	F	Lobo E	4,0	Folicular	-	-	-
15	20	F	Lobo E	4,0	Folicular	-	-	-
16	50	F	Lobo D	3,5	Folicular	-	-	-
17	44	F	Lobo D	0,6	Papilífero	-	-	-
18	78	F	Lobo D	4,2	Papilífero	+	-	-
19	56	F	Lobo E	5,0	Papilífero	-	-	-
20	46	F	Lobo D	6,0	Papilífero	+	-	-
21	62	F	Lobo D	2,8	Papilífero	-	-	-
22	75	M	Lobo E	3,5	Papilífero	+	-	-
23	39	F	Lobo D	3,0	Papilífero	+	-	-
24	29	F	Lobo D	2,5	Papilífero	+	-	-
25	55	F	Lobo D	6,0	Papilífero	-	-	-
26	62	F	Lobo E	1,5	Papilífero	-	-	-
27	39	F	Lobo D	1,5	Papilífero	-	-	-
28	58	F	Lobo D	2,7	Papilífero	+	-	-
29	24	M	Lobo D	3,6	Papilífero	+	-	-
30	34	F	Lobo E	3,0	Papilífero	+	-	-
31	23	F	Lobo E	1,2	Papilífero	+	-	-
32	40	F	Lobo D	1,6	Papilífero	-	-	-
33	21	F	Lobo E	5,0	Papilífero	-	-	-
34	69	F	Lobo D	3,2	Papilífero	-	-	-
35	74	F	Lobo D	2,3	Papilífero	-	-	-
36	78	F	Lobo E	3,9	Papilífero	-	-	-
37	26	F	Lobo D	1,6	Papilífero	+	-	-
38	21	F	Lobo E	3,8	Papilífero	-	-	-
39	60	F	Lobo E	4,5	Papilífero	+	-	-
40	59	M	Lobo D	8,0	Papilífero	+	-	-

# 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](#)