

ELAINE CRISTINA MORARI

**AVALIAÇÃO DE PROGNÓSTICO DO CARCINOMA DE
TIREÓIDE ATRAVÉS DE MARCADORES
IMUNOISTOQUÍMICOS**

CAMPINAS

2006

ELAINE CRISTINA MORARI

**AVALIAÇÃO DE PROGNÓSTICO DO CARCINOMA DE
TIREÓIDE ATRAVÉS DE MARCADORES
IMUNOISTOQUÍMICOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração
Clínica Médica*

ORIENTADORA: LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M796a Morari, Elaine Cristina
Avaliação de prognóstico do carcinoma de tiróide através de marcadores imunistoquímicos. / Elaine Cristina Morari. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador: Laura Sterian Ward
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cancer. 2. Gene. 3. Iodo. 4. Mucinas. 5. Anticorpos.
6. Evolução. I. Ward, Laura Sterian. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Evolution of prognostic of the thyroid carcinoma through immunohistochemical markers

Keywords:

- **Cancer**
- **Gene**
- **Iodine**
- **Mucin**
- **Antibody**
- **Evolution**

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutorado em Clínica Médica

Banca examinadora:

Profª. Drª. Laura Sterian Ward

Profª. Drª. Léa Maria Zanini Maciel

Profª. Drª. Célia Regina Nogueira Lilienthal

Profª. Drª. Maria Letícia Cintra

Profº. Dr. José Vassallo

Data da defesa: 27 - 07 - 2006

*Aos meus pais que eu amo tanto,
obrigada pelo apoio emocional e financeiro,
pelo carinho dedicado por todos esses anos e
pelo incentivo durante essa caminhada.
Vocês são imprescindíveis.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque ele é tudo pra mim, ele é maravilhoso e nunca me abandona, pra ele nada é impossível.

À Dra. Laura, uma pessoa muito dedicada, esforçada, inteligente, que faz tudo pelas suas alunas, muito obrigada pela confiança depositada em mim e pela amizade.

Ao meu querido amigo Romildo, meu companheiro em todas as horas, nas mais difíceis e nas mais alegres. Obrigada por tudo, adoro você!

Ao Luciano, pelo incentivo nessa caminhada, pela ajuda financeira, pela companhia por muitos anos. Agradeço você de coração!

Aos meus irmãos Everson e César, pelo apoio e pelo carinho. Amo vocês!

À minha querida Vó Antônia, pelo carinho e atenção. Amo você!

À minha amiga Herika, que foi minha companheira de mestrado. Amiga nas horas mais difíceis, que esteve ao meu lado quando eu mais precisei. Obrigada.

Às minhas amigas Carina e Cíntia, que chegaram agora, mas já fazem parte da minha vida.

Às amigas do corredor Helen e Viviane, pelo apoio e pelos almoços na copinha (dividindo até a comida), risos, pela amizade.

Às minhas companheiras e amigas de doutorado, Fabiana e Janaína, obrigada pela ajuda, pela amizade, pelas viagens, festas, brigas. Vocês são demais. Fabi saudades!

Às minhas amigas do Gemoca Kika e Natássia, obrigada pela ajuda, pelo carinho, as brigas! Natássia entrou pra me ajudar no trabalho e agora é mestranda! E a Kika minha companheira na defesa de tese, passamos juntas esse momento! Adoro vocês.

Às minhas amigas do Gemoca Flávia e Joyce, pela ajuda no trabalho de imuno, pela amizade, pelas ajudas clínicas! Adoro vocês.

À minha amiga do Gemoca Aline, que quando me sinto triste, ela sempre me alegra, adoro você!

Aos amigos do Gemoca Maria, Juliana, Mario Junior, Renato, Carolina, Priscila, Hélio, obrigada pela ajuda!

Ao André, aluno da medicina, pela grande ajuda.

À Joseane, minha prima e amiga, que esteve aqui no Gemoca durante muito tempo ajudando. Adoro você!

Às meninas que estavam no Gemoca durante esse tempo e são inesquecíveis, Gabriela Campos, Fabiana Urbano, Patrícia Santarosa, Mariana Nicolau.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Patologia Experimental, Julio, Eduardo, Cristiano, Marisa, Glauce, Rose, Helena, obrigada pela ajuda, pela amizade, sem vocês este trabalho não seria possível. Cris, obrigada por tirar todas as minhas dúvidas.

Ao Dr. Marcelo Alvarenga, que permitiu que meu trabalho fosse realizado no Laboratório de Patologia Experimental.

À Dra. Lígia V. M. Assumpção, pela ajuda sempre, uma pessoa admirável.

À Dra. Patrícia Sabino Matos, pela grande ajuda neste trabalho.

Ao Dr. Alfio, sempre ajudando nas coletas.

Às minhas amigas Carla, Sônia, Denise, Eduara, Dely, que de alguma maneira me ajudaram durante esse anos. Adoro vocês!!!

Ao Adilson do HC, pela grande ajuda com o microscópio e com as fotos.

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!!!!

Tudo passará

*“Todas as coisas na Terra passam. Os dias de dificuldades passarão.
Passarão também os dias de amargura e solidão..... As dores e as lágrimas passarão.
As frustrações que nos fazem chorar..... um dia passarão.
A saudade do ser querido que está longe, passará.*

*Dias de tristeza..... Dias de felicidade..... são lições necessárias que na Terra,
passam, deixando no espírito imortal as experiências acumuladas.*

*Se hoje para nós é um desses dias repletos de amargura, paremos um instante,
elevemos o pensamento ao alto..... E guardemos a certeza, pelas próprias dificuldades
já superadas, que não há mal que dure para sempre.*

*O planeta Terra, semelhante a enorme embarcação, às vezes parece que vai
afundar diante das turbulências de gigantescas ondas. Mas isso também passará,
porque Jesus está no leme dessa Nau, segue com um olhar sereno de quem guarda a
certeza de que a agitação faz parte do roteiro evolutivo da humanidade, e que um dia
também passará.... Ele sabe que a Terra chegará a porto seguro, porque essa é a sua
destinação. Assim façamos a nossa parte, o melhor que pudermos, sem esmorecimento,
e confiemos em Deus, aproveitando cada segundo, cada minuto, que por certo.....
também passarão”*

“Tudo passa..... exceto Deus. Deus é suficiente!”

Francisco Cândido Xavier

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Câncer	19
1.2- Câncer de tireóide	20
1.2.1- Incidência do câncer de tireóide.....	20
1.2.2- Nódulos e câncer de tireóide.....	20
1.2.3- Evolução do câncer diferenciado da tireóide.....	22
1.2.4- Fatores clínicos e patológicos de prognóstico.....	23
1.2.5- Sistema transportador de iodo na glândula tireóide.....	26
1.3- O gene NIS	28
1.3.1- Expressão da proteína NIS em tecidos de tireóide	30
1.4- O gene p53	31
1.4.1- p53 e o ciclo celular.....	34
1.5- O gene mucin (MUC1)	35
2- OBJETIVOS	39
3- METODOLOGIA	41
3.1- Casuística	42
3.1.1- Pacientes.....	42
3.1.2- Seguimento.....	43
3.1.3- Estadiamento.....	44

3.2- Métodos.....	45
3.2.1- Técnica da imunistoquímica.....	46
3.2.2- Reação da imunoperoxidase.....	46
3.2.3- Leitura dos resultados.....	48
4- RESULTADOS.....	49
4.1- Imunistoquímica para p53.....	54
4.2- Imunistoquímica para MUC1	57
4.3- Imunistoquímica para NIS	61
5- DISCUSSÃO.....	67
6- CONCLUSÃO.....	74
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

CDK	Ciclina quinase dependente
CDT	Carcinoma diferenciado da tiróide
CA	Carcinoma anaplásico
CF	Carcinoma folicular
CM	Carcinoma medular
CP	Carcinoma papilífero
CPVA	Carcinoma papilífero variante de células altas
CPVF	Carcinoma papilífero variante folicular
hNIS	Gene transportador de sódio e iodo humano
I	Iodo
¹³¹I	Iodo radioativo
IHQ	Imunoistoquímica
MUC	Gene mucina
NIS	Gene transportador de sódio e iodo
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PCI	Pesquisa de corpo inteiro
Tg	Tireoglobulina
TNM	Estadiamento: Tamanho do tumor (T); acometimento de nódulos (N); metástase à distância (M)
TPO	Tireoperoxidase
TSH	Hormônio tirotrófico
T₃	Triiodotironina
T₄	Tetraiodotironina ou tiroxina

		<i>Pág.</i>
Figura 1	Representação esquemática da captação de iodo e o caminho da biossíntese dos hormônios tireodianos nos tirócitos.....	29
Figura 2	Desenho esquemático do gene humano NIS - co-transportador de sódio/iodo, representando uma proteína de membrana com 13 domínios transmembrana, a parte amino-terminal e a parte carboxi-terminal.....	30
Figura 3	Ilustração mostrando como a p53 retém o ciclo celular em G1.....	33
Figura 4	Correlação entre a posição dos genes MUC e sua maior expressão nos tecidos.....	37
Figura 5	Mediadores (fatores de crescimento e citocinas) e o caminho da sinalização intracelular gene MUC.....	38
Figura 6	Curva de kaplan-Meier representando a probabilidade estimada de sobrevida em pacientes com presença de metástases (M1) ou ausência de metástases (M0).....	53
Figura 7	Carcinoma de mama: expressão nuclear da proteína p53 (abaixo) pela técnica de imunistoquímica.....	55
Figura 8	Carcinoma papilífero da tireóide: ausência da expressão da proteína p53 (0) pela técnica de imunistoquímica (aumento original x 400).....	56
Figura 9	Carcinoma papilífero variante de células altas da tireóide: expressão nuclear da proteína p53 (3+).....	56
Figura 10	Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão nuclear da proteína p53 (2+) (marrom) e a ausência da expressão da proteína p53 (azul).....	57
Figura 11	Carcinoma papilífero variante de células altas da tireóide: expressão citoplasmática intensa e difusa da proteína MUC1.....	58

Figura 12	Carcinoma papilífero clássico da tireóide: ausência da expressão da proteína MUC1 pela técnica de imunistoquímica.....	59
Figura 13	Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão intensa e difusa citoplasmática da proteína MUC1 (marrom) pela técnica de imunistoquímica (aumento original 400x).....	59
Figura 14	Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão citoplasmática da proteína MUC1.....	60
Figura 15	Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão citoplasmática difusa da proteína MUC1.....	60
Figura 16	Carcinoma papilífero variante de células altas da tireóide: expressão citoplasmática difusa da proteína MUC1.....	61
Figura 17	Doença de Graves: expressão de membrana intensa e difusa da proteína NIS pela técnica de imunistoquímica, utilizada como controle positivo.....	62
Figura 18	Doença de Graves: expressão intensa e focal de membrana e de citoplasma da proteína NIS.....	63
Figura 19	Carcinoma papilífero clássico da tireóide: ausência da expressão da proteína NIS pela técnica de imunistoquímica (aumento original X200).....	63
Figura 20	Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão intensa e difusa da proteína NIS em membrana e citoplasma.....	64
Figura 21	Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para pacientes com expressão de p53 positiva e negativa.....	65
Figura 22	Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para pacientes com expressão de MUC1 positiva e negativa.....	65
Figura 23	Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para pacientes com expressão de NIS positiva e negativa.....	66
Figura 24	Comparação da quantificação da expressão de mRNA por PCR em tempo real em dois grupos: em verde boa evolução e em vermelho má evolução.....	71

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Resumo dos dados clínicos dos pacientes estudados.....	42
Tabela 2 Características anatomo-patológicas dos casos com TNM, estadio, Tg e evolução sem doença aparente (boa) e com doença aparente ou óbito (ruim), dos pacientes com CDT de tipo papilífero (CP) e folicular (CF).....	45
Tabela 3 Comparação do grau de diferenciação (I-Bem diferenciado; II-Moderadamente diferenciado; III-Pouco diferenciado) com a evolução dos pacientes boa (sem doença aparente) e ruim (com doença aparente ou óbito).....	51
Tabela 4 Comparação do estadiamento TNM (T-tamanho do nódulo, N-acometimento linfonodal e M-metástase à distância) com a evolução dos pacientes boa (sem doença aparente) e ruim (com doença aparente ou óbito).....	52
Tabela 5 Correlação entre o estadio da doença ao diagnóstico com a evolução boa (sem doença aparente) e ruim (doença aparente ou óbito).....	54
Tabela 6 Resultados de imunistoquímica para p53.....	55
Tabela 7 Resultados de imunistoquímica para MUC1.....	58
Tabela 8 Resultados de imunistoquímica para NIS.....	62

RESUMO

Como a maior parte dos carcinomas diferenciados tem um excelente prognóstico, alguns autores consideram o tratamento convencional, isto é, a tireoidectomia total seguida de ablação actínica de remanescentes glandulares, excessivo. Combinações de fatores específicos do paciente e do tumor foram propostas para classificação prognóstica, mas na prática são pouco utilizadas. Os resultados de alguns trabalhos sugerem relação entre a expressão dos genes MUC, p53 e NIS e a evolução clínica das neoplasias tireoidianas. Com o objetivo de investigar a utilidade clínica de marcadores imunoistoquímicos de prognóstico, estudamos 67 nódulos tireoidianos, incluindo 57 carcinomas, dos quais incluiu 34 (50,74%) carcinomas papilíferos, sendo 21 (31,3%) casos do tipo histológico clássico, 7 (10,4%) da variante de células altas e 6 (9%) da variante folicular. Avaliamos também 16 (23,9%) carcinomas foliculares, 4 (6%) medulares e 3 carcinomas anaplásicos (4,5%). Dez casos (14,9%) foram obtidos de pacientes submetidos à cirurgia com o diagnóstico de doenças benignas da tiróide (3 casos de bócio nodular, 4 adenomas foliculares e 3 tecidos tireoidianos normais). Todos os pacientes foram submetidos a um mesmo protocolo de tratamento e acompanhados por 66 ± 28 meses (mediana de 63 meses) sendo classificados como apresentando evolução favorável ou desfavorável. Consideramos de evolução desfavorável os 19 pacientes que possuíam evidência de recorrência local ou à distância ou que foram a óbito durante o seguimento pela doença. Realizamos estudos imunoistoquímicos da detecção das proteínas NIS, p53 e MUC1 comparando-os com a evolução dos pacientes. Mostramos que pacientes com carcinomas bem diferenciados, ausência de metástases, estadio II e estadiamento T2 têm uma evolução melhor em relação aos pacientes com carcinomas pouco diferenciados, presença de metástases, estadio IV e estadiamento T4. Não encontramos relação entre a expressão das proteínas NIS, p53 e MUC1 e a evolução dos pacientes estudados.

ABSTRACT

Because most differentiated thyroid carcinomas have an excellent prognosis, some authors have been claiming that these patients have been over-treated. Combinations of patient-and tumor-specific factors have been proposed for prognostic stratification, but no clinicpathologic staging was demonstrated to be useful at the present time. In order to investigate the clinical utility of immunohistochemistry markers, we studied 67 thyroid nodules including 50 thyroid carcinomas. There were 34 (50,74%) papillary carcinomas, including 21 (31,3%) cases of the classical histological type, 7 (10,4%) tall cell variants and 6 (9%) of the follicular variant type. Also, there were 16 (23,9%) follicular carcinomas, 4 (6%) medullary and 3 anaplastic carcinomas (4,5%). Ten patients (14,9%) were submitted to surgery because of benign thyroid diseases (3 nodular goiter cases, 4 follicular adenomas and 3 thyroid tissues normal). All patients were submitted to a similar management protocol and followed-up for 66 ± 28 months (median of 63 months) and classified as presenting a good or a bad evolution. We considered as presenting a bad evolution 19 patients that presented evidence of local or distant recurrence and the patients that died during the follow-up. Immunohistochemical expression of NIS, p53 and MUC1 proteins was compared to patient's evolution. We showed that patient with well differentiated thyroid carcinomas, absence of distant metastases, stage II and staging T2 have a better evolution in relation to the patients with poorly differentiated thyroid carcinomas, presence of metastases, stage IV and staging T4. We were able to find relation between the expression of proteins NIS, p53 and MUC1 and prognostic of the studied patients.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Câncer

Dados epidemiológicos sugerem que novos casos de câncer poderiam ser evitados pela implementação de estratégias preventivas, já que 80% a 90% dos tumores humanos podem ser atribuídos a fatores ambientais, incluindo a dieta, e aspectos sociais e culturais (Osborne et al.,1997).

O câncer ocorre por causa de danos genéticos herdados e/ou adquiridos que alteram a expressão ou as propriedades bioquímicas de genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular (Bishop, 1987; Knudson, 1993; Ward, 1997). Sabe-se que estes danos genéticos conferem uma vantagem à célula afetada, a qual, quando consegue transmitir às suas células filhas esta vantagem, dá origem a um clone de células que escapa dos controles normais de crescimento e diferenciação (Namba H, 1990). Anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular (chamados de oncogenes), como nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular (chamados de genes supressores tumorais), podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais (Ward e Fagin, 1998). Os genes que controlam o tempo de vida ou a morte celular, como o gene da telomerase, os genes envolvidos na apoptose e os genes de reparo do DNA também intervêm diretamente no processo de tumorigênese. Quanto mais tempo uma célula viver, maior será sua chance de adquirir mutações vantajosas em termos de crescimento e diferenciação. Os genes de reparo do DNA controlam a proliferação ou sobrevivência das células indiretamente ao influenciarem a capacidade do organismo de reparar as lesões não letais em outros genes, incluindo os proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes que regulam a apoptose. Qualquer anormalidade nos genes de reparo do DNA pode causar mutações no genoma, causando assim uma transformação neoplásica. No entanto, para que um tumor progrida, aumentando de tamanho e se tornando invasivo, vários outros genes devem se alterar. Sabe-se que o processo de metástase é seletivo para as poucas células que conseguem produzir vasos (angiogênese), mover-se vencendo barreiras e invadindo as células vizinhas, cápsulas etc, embolizar e sobreviver na corrente sanguínea, parar em leitos capilares distantes e extravasar e se multiplicar dentro do parênquima de outros órgãos. Todos estes passos requerem ativação e/ou desativação de uma série de genes (Ward, 1997). Existem vários genes envolvidos no reconhecimento, reparo ou programação da morte celular (apoptose), assim como genes envolvidos no

controle imunológico de reconhecimento e reparo/destruição das células danificadas, genes capazes de interferir na capacidade de multiplicação à distância, invadir tecidos circunjacentes, fatores angiogênicos capazes de prover aporte nutricional a estas células de crescimento acelerados e vários outros fatores fundamentais para a progressão de um clone tumoral primário para fenótipos mais agressivos com invasão e metastatização à distância (Ward, 1997; Fidler, 1997).

1.2- Câncer de tireóide

1.2.1- Incidência do câncer de tireóide

O câncer de tireóide pode ser considerado raro embora seja o tumor endócrino mais freqüente (Jemal et al., 2004; American Cancer Society, 2003). É muito provável que tenha-se no Brasil números semelhantes aos dos Estados Unidos da América, onde estima-se que 25.690 (6.500 homens e 19.190 mulheres) novos casos foram diagnosticados em 2005 e 1490 indivíduos morreram por câncer diferenciado da tireóide (CDT) (Surveillance, Epidemiology and End Results). O CDT corresponde a aproximadamente 1% de todos os tipos de câncer com incidência de 0,5% em homens e 1,5% em mulheres, e a 0,5% de mortes relacionadas a câncer (Hundahl et al. 2000; Jemal et al., 2004). A incidência é maior nos países onde o bócio é endêmico. Nestes países também existe maior prevalência das formas tumorais menos diferenciadas, como o carcinoma folicular e o anaplásico (Ward, 2000).

Trata-se de um câncer que pode ser precocemente detectado graças à facilidade da citologia obtida por punção por agulha fina e da ampla disponibilidade da ultra-sonografia para visualização de imagens cervicais. Apesar de o prognóstico geralmente ser favorável, a taxa de recorrência costuma ser alta com 14%-22% dos casos, e uma taxa anual de recidiva de 1,8% para os primeiros dez anos (Jemal et al. 2004; Ward et al. 2004).

1.2.2- Nódulos e câncer de tireóide

Nódulos de tireóide são extremamente comuns. Estima-se que 10% da população venham a desenvolver um nódulo palpável durante a vida e vários dados indicam que este número deve ser ainda maior em nosso país, onde, a poucas décadas atrás,

ainda havia extensas áreas carentes de aporte adequado de iodo na alimentação (Welker e Orlov, 2003; Knobel e Medeiros-Neto, 2004; Tomimori et al., 1995; Furlanetto et al., 2000). Mais recentemente, o uso da ultra-sonografia como método acessível a grandes populações e de custo relativamente pequeno em nosso meio, vem aumentando sensivelmente o número de pacientes com nódulos diagnosticados já que a ultra-sonografia diagnostica nódulos em até 67% da população (Chow et al., 2003; Hegedus et al., 2003; Tan e Gharib, 1997). No entanto, a maioria dos nódulos tireoidianos é causada por doenças benignas, como nódulos colóides, cistos e neoplasias foliculares benignas, de modo que menos de 5% dos pacientes são portadores de câncer de tireóide (Tan e Gharib, 1997; Hegedus et al., 2003).

Os tumores benignos da tireóide são denominados adenomas. São raros, de origem epitelial, bem encapsulado, não invadem os tecidos vizinhos e não produzem metástases. Os tumores malignos da tireóide são raros e apresentam quadros clínicos extremamente variáveis, desde aqueles com crescimento muito lento e compatível com uma expectativa de vida normal, até aqueles com péssima evolução e que levam ao óbito em períodos de semanas ou meses.

Carcinomas da tireóide são derivados tanto de células foliculares como para-folicular células C. O CDT, papilífero ou folicular, se caracteriza por apresentar uma série de funções que são encontradas na célula tireoidiana normal. Por exemplo, a maioria dos CDT também expressam proteínas que são normalmente expressas na célula folicular, como a Tg e o transportador de sódio/iodo (NIS) (Graf, 2005). Carcinoma papilífero, o qual é o mais freqüente tipo de câncer de tireóide, acomete aproximadamente 85% dos casos relatados. Carcinoma folicular é o segundo tipo mais comum. Há um pequeno número de carcinomas indiferenciados denominados tumores anaplásicos que são mais agressivos e sempre fatais. O carcinoma de tireóide medular é derivado de células C para-foliculares, tem uma taxa de herança familiar de aproximadamente 10% (Robbins et al. 1991).

Embora a citologia obtida através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seja um excelente método diagnóstico, de reconhecido bom custo-efetividade também em nosso meio, fazer a seleção de malignidade por PAAF torna-se impraticável em nível

populacional e seu custo proibitivo se estivermos diante de percentagens assustadoras como as representadas pela prevalência do nódulo (Ward et al., 1997; Welker e Orlov, 2003; Castro e Gharib, 2000).

1.2.3- Evolução do câncer diferenciado da tireóide

O CDT, principalmente quando precocemente diagnosticado, é um tumor geralmente curável. O tratamento considerado mais adequado, a tireoidectomia total seguida de ablação actínica com ^{131}I , oferece ao paciente um prognóstico muito bom, com sobrevida longa, similar à da população que nunca teve câncer em mais de 80% dos casos (Mazzaferri e Jhiang, 1994; Schlumberger, 1999). Após a cirurgia e a radioiodoterapia, os pacientes são tratados com levotiroxina, visando reduzir os níveis séricos de TSH para minimizar o crescimento de qualquer tumor residual. Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI) e medidas de tireoglobulina (Tg) sérica são usadas para monitorar os pacientes. Embora esta abordagem terapêutica proporcione uma sobrevida que atinge 93%-98% e 85%-92% dos carcinomas papilífero e folicular, respectivamente, o índice de recorrências é relativamente elevado (Mazzaferri e Jhiang, 1994; Schlumberger, 1999; Hay et al., 1993). Indivíduos com carcinomas papilíferos (CP) apresentam recorrências em 15% a 22% dos casos, a uma taxa de 1,8% ao ano para a primeira década após o tratamento (Mazzaferri e Young, 1981; Simpson et al., 1988). Cerca de 85% destas recorrências envolvem os linfonodos cervicais, 32% ocorrem em leito cervical e 12% à distância (Mazzaferri e Young, 1981; Simpson et al., 1988; Ruegmer et al., 1988; Ronga et al., 2002). Os carcinomas foliculares (CF) apresentam metástases à distância mais freqüentemente (cerca de 17% dos casos) do que os CP (Mazzaferri e Jhiang, 1994; Schlumberger, 1999; Hay et al., 1993; Mazzaferri e Young, 1981; Simpson et al., 1988; Ruegmer et al., 1988; Ronga et al., 2002).

Quando o câncer é precocemente detectado, com a citologia facilmente obtida por uma simples PAAF, a mortalidade pelo CDT é relativamente baixa, menor que 5%, dificultando entender o impacto de diferentes modalidades terapêuticas na sobrevida (Hay et al., 1993). Para o diagnóstico de metástases linfonodais, o tempo médio costuma ser de cinco anos e para ocorrência de metástases a distância cerca de 8 anos após o

diagnóstico (Mazzaferrri e Young, 1981; Chow et al., 2002). A sobrevida média dos pacientes que vão a óbito por causa do CDT é de 6 a 10 anos (Mazzaferrri e Young, 1981; Hay et al., 1998).

Infelizmente, nem todos os casos de CDT são diagnosticados precocemente, sete a 20% dos pacientes evoluem com metástases e não respondem ao tratamento (Jemal et al., 2003). Esta minoria de casos com comportamento agressivo deveria ser diferenciada dentre os demais merecendo, por exemplo, um seguimento mais rigoroso e uma série de novas abordagens terapêuticas como o uso de retinóides visando a rediferenciação celular; radiosensibilizadores; terapia gênica com reintrodução de NIS; bloqueadores de acetilação.

1.2.4- Fatores clínicos e patológicos de prognóstico

Com o intuito de otimizar a abordagem cirúrgica e o seguimento dos pacientes com CDT, tem-se buscado identificar fatores de prognóstico que possam, essencialmente, dividir esses pacientes em indivíduos de baixo risco e de alto risco (Shaha, 1998; Hadjieva, 2001; Dean e Ray, 2000; Gilliland et al., 1997; Hundahl et al., 1998).

O câncer de tireóide ocorre em todas as idades, com dois picos: o menor entre 7 e 20 anos, o maior entre 40 e 65 anos (Drinkwater e Sugden 1991). Dados do programa de vigilância epidemiológica norte-americana (Surveillance Epidemiology and End Results program – SEER) e da base norte-americana de dados em câncer (National Cancer Data Base – NCDB) ilustram a importância da idade sobre os índices de sobrevida mostrando sobrevidas de 95% a 100% em cinco anos para pacientes abaixo dos 45 anos de idade em estadio I-II (Gilliland et al., 1997; Hundahl et al., 1998).

Pacientes com menos de 20 anos de idade têm 99% de sobrevida em dez anos, em contraste com os pacientes com mais de 70 anos que possuem 86% e 70% de chance de estarem vivos, para os CP e CF, respectivamente (Jemal et al., 2003). A influência da idade é ainda mais importante para os pacientes de 60 a 69 anos de idade, com queda de sobrevida para 65% e 57% em dez anos para o CP e CF, respectivamente (Jemal et al., 2003; Hundahl et al., 1998).

Os homens têm metade da frequência de CDT que as mulheres, porém o dobro do risco de morrer por ele, talvez porque eles sejam mais idosos que as mulheres ao diagnóstico (Mazzaferri e Jhiang, 1994; Mazzaferri e Kloos, 2001). Nos Estados Unidos da América, o câncer de tireóide é aquele que apresenta o maior crescimento anual de incidência em mulheres (mais de 100% de aumento na incidência de 1975 a 2002) (Surveillance Epidemiology and End Results program – SEER).

Em estudo recente, nosso grupo demonstrou que a presença de anticorpos, assim como a ocorrência de doença autoimune anterior, indicavam melhor evolução nos pacientes com CDT (Souza et al., 2003). A chance de um paciente com anticorpo anti TPO negativo era 17,053 vezes mais elevada (OR=17,053; 95% IC:2.057-141.34) do que a do paciente sem a presença do anticorpo anti TPO positivo de apresentar recorrência, metástase ou morte pelo CDT (Souza et al., 2003). Os pacientes com antecedentes de doença tireoidiana autoimune tiveram uma chance 3,75 vezes maior de evoluir livres de doença, enquanto nos pacientes com anticorpos positivos esta chance era 12,19 vezes maior do que nos pacientes com anticorpos negativos, sugerindo que a lesão autoimune concomitante ou prévia exerce um efeito protetor na glândula acometida pelo CDT (Souza et al., 2003).

Em relação ao acometimento de linfonodos, o envolvimento ganglionar não influenciou no prognóstico dos pacientes acompanhados em nosso Ambulatório de Câncer da Tireóide comandando pela Profa. Dra. Ligia Vera Montalli da Assumpção, na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. O tempo de sobrevida livre de doença foi similar, na avaliação por análise univariada, de pacientes com e sem metástases linfonodais por CP ou CF ($p=0.2$ e $p=0.09$ para CP e CF, respectivamente). A análise multivariada para sobrevida também não mostrou influência do acometimento ganglionar primário na evolução do CDT (Ward et al., 2003b). A remoção de linfonodos suspeitos tem impacto discutível no tempo livre de doença e na sobrevida dos pacientes (Mazzaferri e Young, 1981; Dean e Ray, 2000; Cady, 1998; Mirallie et al., 1999). A dissecação sistemática de linfonodos melhora significativamente os índices de recorrência e sobrevida em pacientes com tumores T1-T3, embora tal conclusão possa não ser aplicável a pacientes de moderado ou baixo risco, nem haja consenso quanto a sua utilidade em termos de diminuição de mortalidade (Mazzaferri e Kloos, 2001; Sato et al. 1998).

A literatura é unânime em relação ao mau prognóstico de pacientes com metástases à distância, que aparecem em 5% a 23% das grandes séries (Mazzaferrri e Jhiang, 1994; Schlumberger, 1999; Hay et al., 1993; Mazzaferrri e Young, 1981; Simpson et al., 1988; Ruegemer et al., 1988; Ronga et al., 2002; Chow et al., 2002; Samaan et al., 1983; Schlumberger et al., 1986; Shaha, 1998; Hadjieva, 2001; Dean e Hay, 2000; Gilliland et al., 1997; Hundahl et al., 1998; Hay et al., 1993; Cady e Rossi, 1988; Cady, 1998; Assumpção et al., 2002; Mazzaferrri e Kloos, 2001; Souza et al., 2003; Ward et al., 2003b). Metástases pulmonares causando insuficiência respiratória, hemorragia maciça e obstrução das vias aéreas pelo crescimento tumoral, juntamente com colapso circulatório decorrente de compressão de veia cava por metástases mediastinais ou externos, são as causas imediatas de morte mais freqüentemente relatadas no CDT (Kitamura et al., 1999). É importante salientar que a mortalidade relacionada às metástases sofre influência da idade mais avançada, da presença de sintomas decorrentes das metástases, de sua localização e do seu tratamento com radioiodo (Shoup et al., 2003). Mesmo os pacientes com metástases ao diagnóstico ou que desenvolvem metástases após a cirurgia têm uma sobrevida relativamente longa, girando em torno de quatro anos, com 26% dos pacientes vivos em dez anos (Shoup et al., 2003). Isto é particularmente mais evidente em crianças e adultos jovens (Shoup et al., 2003). Em uma série de 83 crianças seguidas por mais de 10 anos, La Qualgia et al., 2000, descreveram 100% de sobrevida aos 10 anos, enquanto apenas 31% dos casos apresentaram progressão da doença após tratamento do tumor primário e das metástases.

Na verdade, é difícil avaliar o impacto de todos os fatores clínicos e patológicos que, reconhecidamente, influem na sobrevida livre de doença (como sexo, tamanho e extensão do tumor, tipo histológico) por causa do diagnóstico precoce e excelente sobrevida da maior parte dos pacientes com CDT. Muitos sistemas de estadiamento são derivados de análises multivariadas que não consideram o efeito da terapia, algumas delas nem sequer considerando o índice de recorrência. Para complicar mais ainda a interpretação dos dados, existe o fato de que, embora tenham excelente prognóstico, crianças e pacientes jovens apresentam elevada freqüência de recorrências (Mazzaferrri e Kloos, 2001). Brierley et al., 1997, comparou os vários sistemas de estadiamento e prognóstico atualmente propostos e concluiu que nenhuma delas mostra qualquer vantagem sobre o

clássico sistema TNM proposto pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) e pela International Union Against Cancer (IUAC). Por outro lado, o uso desses fatores clínicos e patológicos permite definir pacientes de risco baixo, de risco elevado e um grupo de pacientes de risco intermediário (jovens com menos de 45 anos de idade mas com tumores de elevado risco) (Shaha et al., 1998).

Tem-se buscado intensamente parâmetros que possam, com maior segurança do que os clínico-patológicos, indicar já ao diagnóstico uma abordagem cirúrgica mais ou menos agressiva e que permitam estabelecer risco maior ou menor de recorrência ou recidiva para cada indivíduo, o que implicaria em maior atenção e rigor no seguimento de alguns pacientes em relação à grande maioria dos casos. Também nos preocupam os pacientes que, embora inicialmente responsivos, deixam de se beneficiar com o uso de ^{131}I ao apresentar recidivas e/ou metástases. O uso desses indicadores clínicos poderia poupar a grande maioria dos pacientes de uma cirurgia mais radical ou dos controles periódicos freqüentes de Tg e PCI, mas ainda não se tem segurança no uso dos mesmos; por outro lado, seguramente, eles nos permitem aumentar a vigilância sobre os casos de maior risco.

1.2.5- Sistema transportador de iodo na glândula tireóide

A tireóide é uma glândula endócrina de papel central no metabolismo intermediário de todos os tecidos e é de fundamental importância para o desenvolvimento do sistema nervoso central nos fetos e recém-nascidos. A glândula trabalha basicamente na biossíntese e secreção de dois principais hormônios, triiodotironina (T_3) e tiroxina (ou tetraiodotironina) (T_4). O iodo é um componente essencial de ambos. Assim, a função tireoidiana como um todo e todas as funções sistêmicas correlacionadas a ela dependem de um adequado suprimento de iodo para a glândula (Greenspan, 2006).

A Tg iodada é armazenada no colóide e vai fornecendo resíduo iodado que é destacado por hidrólise da molécula de Tg e endocitado em resposta à demanda por hormônios da tireóide. Esses hormônios (T_3 e T_4) são secretados na circulação e as iodotirosinas não secretadas são metabolizadas a tirosina I. Esse processo facilita a reutilização de iodo (Greenspan, 2006).

A tireotrofina (TSH) estimula todas as etapas do metabolismo do iodo assim como seu transporte através da AMPc. A captação do iodo, tanto *in vivo* como *in vitro*, assim como a expressão do NIS em cultura de células são controladas pelo TSH (Strum et al., 1983, Carrasco, 1999). NIS também medeia a atividade do transporte de iodo em outros tecidos, como as glândulas salivares, mucosa gástrica e glândula mamária (Strum et al., 1983, Carrasco, 1999).

A concentração de iodo na glândula é muito superior à concentração plasmática. Um notável sistema, eficiente e especializado, garante que a maior parte do iodo ingerido na dieta seja acumulado na glândula e, dessa maneira, fique disponível para a biossíntese do T₃ e T₄. A importância deste sistema torna-se mais evidente quando se considera que o iodo pode estar escasso no meio ambiente. Bócio endêmico e cretinismo, causados primariamente por insuficiência no suprimento de iodo, subsistem como importantes problemas de saúde em muitas partes do mundo, afetando milhões de pessoas (Delange, 1994; Tyler, 1996). A habilidade das células foliculares em concentrar iodo foi reportada pela primeira vez em 1915 (Marine e Feiss, 1915). Para ser capaz de concentrar iodo 30 a 40 vezes mais do que no plasma, a glândula possui uma proteína intrínseca da membrana plasmática que efetua o transporte de iodo juntamente com o de sódio para a tireóide. Este co-transportador Na⁺/I⁻ (Sodium Iodide Symporter) é denominado NIS (Wolff, 1964, Carrasco, 1993, Daí, 1996; De Groot et al., 1995). Algumas das propriedades dessa proteína e do gene que a codifica foram elucidadas nestes últimos anos (Carrasco, 1993; Levy et al., 1998; Schmutzler e Kohrle, 1998; Spitzweg et al., 1998). Resumidamente, o acúmulo de iodo na tireóide ocorre por um transporte ativo, contra um gradiente eletroquímico, estimulado por TSH e bloqueado por inibidores competitivos, os ânions tiocianato e perclorato (Figura 1).

A proteína NIS é essencial para a produção de hormônios tireoidianos de forma que qualquer alteração que resulte em modificação da sua expressão/ e ou função resultará em uma disfunção tireoidiana, frequentemente identificada pela ocorrência de hipotireoidismo congênito. Já existem várias descrições de defeitos genéticos de NIS implicados em casos de hipotireoidismo por disormonogênese (Fujimara et al., 1997; Kosugi et al., 1998).

Com o uso de iodo radioativo, desenvolveram-se métodos cintilográficos muito utilizados no diagnóstico de tecido tireoidiano hiperfuncionante ou não, tóxico ou ectópico. Doses farmacológicas de radiodo podem destruir tecido tireoidiano ou indicar sua presença, no caso das metástases, sendo utilizadas amplamente na radioiodoterapia do hipertireoidismo e do câncer de tireóide (Tyler, 1996).

1.3- O gene NIS

O gene NIS foi clonado há poucos anos (Carrasco, 1993; Daí et al., 1996). Após a clonagem em camundongos, o gene NIS humano (hNIS) foi clonado a partir de uma biblioteca de cDNA em 1996 (Smanik et al., 1996). O gene NIS está localizado no cromossomo 19p12-13.2 e codifica uma glicoproteína de 643 aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 70-90 kDa. A região codificadora de NIS é composta de 15 exons e 14 introns (Smanik et al., 1997). Como um membro dependente da família transportadora de sódio, NIS é uma proteína de membrana intrínseca com 13 domínios transmembrana, um domínio extracelular amino-terminal e um domínio intracelular carboxi-terminal (Figura 2) (Levy et al., 1998).

NIS é uma molécula chave na patofisiologia da tireóide por traçar a rota pela qual o iodo atinge a glândula para biossíntese de hormônios e como um meio para diagnóstico cintilográfico e tratamento (De Groot et al., 1995).

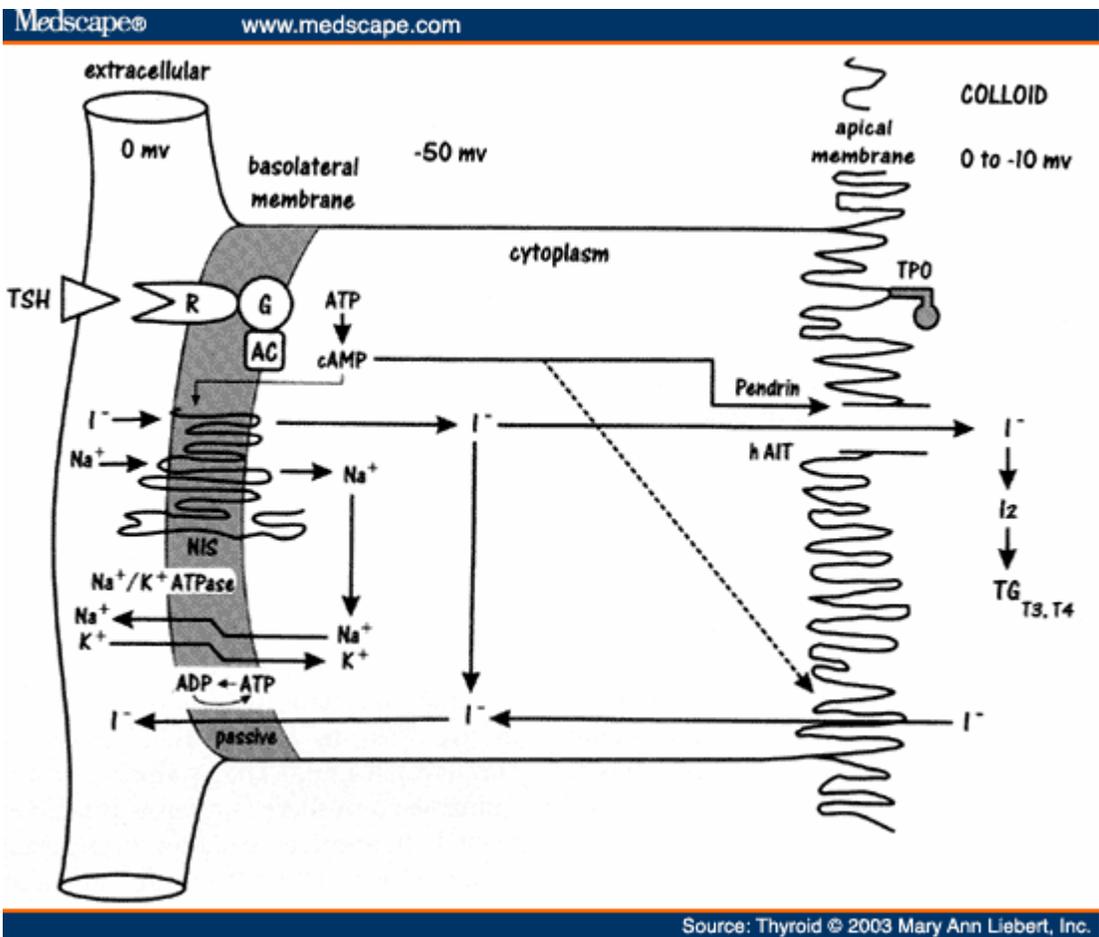


Figura 1- Representação esquemática da captação de iodo e o caminho da biossíntese dos hormônios tireodianos no tirócitos: O iodo ativo é acumulado do lado de fora da membrana plasmática basolateral dos tirócitos em um processo catalisado por NIS. O iodo é passivamente transportado de fora da membrana apical para o tirócito dentro do colóide, onde é usado para a iodação da Tg. Esta reação é chamada de organificação, é catalisada por TPO e requer H₂O₂. A Tg iodada contendo hormônios tireoidianos, é estocada no colóide. Os hormônios T₃ e T₄ são liberados da Tg e secretados no sangue. Todos os passos do caminho da biossíntese dos hormônios tireoidianos são estimulados por TSH.

Co-transportador Humano de Sódio/Iodo - NIS

adaptado de Levy et al, JBC 98

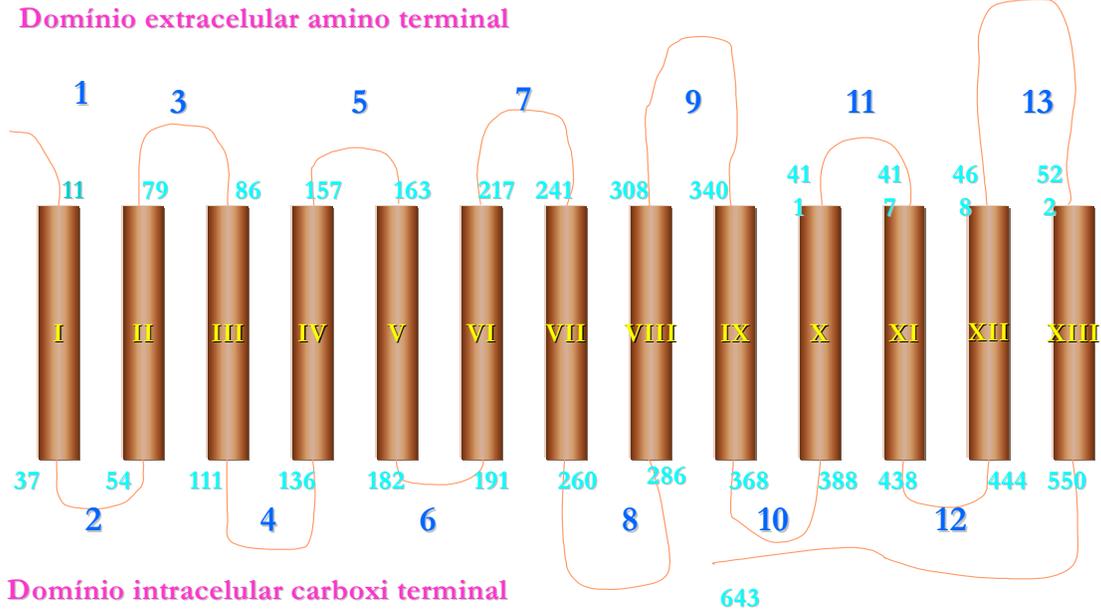


Figura 2- Desenho esquemático do gene humano NIS - co-transportador de sódio/iodo, representando uma proteína de membrana com 13 domínios transmembrana, a parte amino-terminal e a parte carboxi-terminal.

1.3.1- Expressão da proteína NIS em tecidos de tireóide

A expressão da proteína NIS é aumentada em doença de Graves e diminuída em tecidos tumorais em relação à tireóide normal (Saito et al., 1997; Smanik et al., 1997). A perda da capacidade de captação de iodo em CDT é principalmente em razão da perda funcional da expressão de NIS (Filetti et al., 1999; Spitzweg et al., 2001; Dohán et al., 2003).

A produção de anticorpos específicos contra NIS tem facilitado o estudo da expressão dessa proteína. Apesar da presença de altos níveis de mRNA de NIS humano, glândulas de tireóide normal exibem uma expressão heterogênea da proteína NIS. Estudos em imunistoquímica mostraram que somente uma minoria (aproximadamente 30%) das células foliculares expressa uma quantidade detectável da proteína NIS

(Jhiang et al., 1998; Caillou et al., 2006). Diferentemente, em doença de Graves e adenomas tóxicos a proteína NIS aparece fortemente corada e é detectada na maioria dos tirócitos, correspondendo a altos níveis de mRNA para NIS detectados nesses tecidos (Ajjan et al., 1998; Saito et al., 1997). Como esperado, a polarização das células tem sido observada, com imunistoquímica da proteína NIS limitando-se à membrana basolateral dos tirócitos (Filetti et al., 1999).

Embora a captação de iodo na maioria dos cânceres de tireóide seja menor em relação ao tecido normal, em geral, a captação ainda é suficiente para permitir administração de radiodo para destruir células tumorais remanescentes e metástases. Esclarecer a causa da diminuição da captação de iodo em câncer de tireóide é fundamental para obter um maior entendimento dessa doença. A questão fundamental é se a captação de iodo é reduzida pela perda da expressão funcional do NIS em células com câncer de tireóide, com um defeito ocorrendo no nível de expressão do gene, ou por alteração da localização da proteína ou por algum outro mecanismo desconhecido (Filetti et al., 1999; Spitzweg et al., 2001; Dohán et al., 2003).

1.4- O gene p53

O gene p53 é um dos mais importantes genes supressores tumorais e é um dos atores principais no controle da divisão celular, funcionando também como regulador da transcrição celular (Mendoza-Rodriguez e Cerbon, 2000). O gene p53 codifica a proteína p53. Está localizado em 17p13 e contém 11 exons abrangendo 20 Kb. Pertence a uma família de genes altamente conservados que também incluem p63 e p73 (Savkur e Burris, 2004).

O papel primário do gene p53 é manter a integridade genética da célula. O gene p53 tem um fundamental papel na regulação da célula em resposta a vários estresses, incluindo agressões genotóxicas (alterações no DNA induzidas por irradiação, UV, carcinógenos, biológicos, drogas citotóxicas). P53 exerce sua ação antiproliferativa por indução reversível ou irreversível, parando o ciclo celular. Acredita-se que outra ação

específica seja através do desencadeamento da apoptose (Vousden e Lu 2002). Ele também pode atuar no processo de reparação do DNA e inibir a angiogênese. A função de p53 está freqüentemente alterada no câncer. Uma série de mutações tem sido relatada em p53, principalmente nos exons 5 a 8 (Fagin 2000).

Em células normais, não expostas ao estresse, o nível e a atividade de p53 são muito baixos. Quando ocorrem danos no DNA, o p53 é ativado e os níveis da proteína p53 rapidamente se elevam promovendo uma parada do ciclo celular em G1 para que os danos sejam reparados. Se o gene for alterado em virtude de alguma variação genética, tais como polimorfismos, ou a uma mutação adquirida, ele não é capaz de induzir a parada no ciclo celular ou indução da apoptose, o que pode ocasionar progressão sem controle e, portanto, uma vantagem de crescimento para a célula em questão (Figura 3) (Santos et al., 2006).

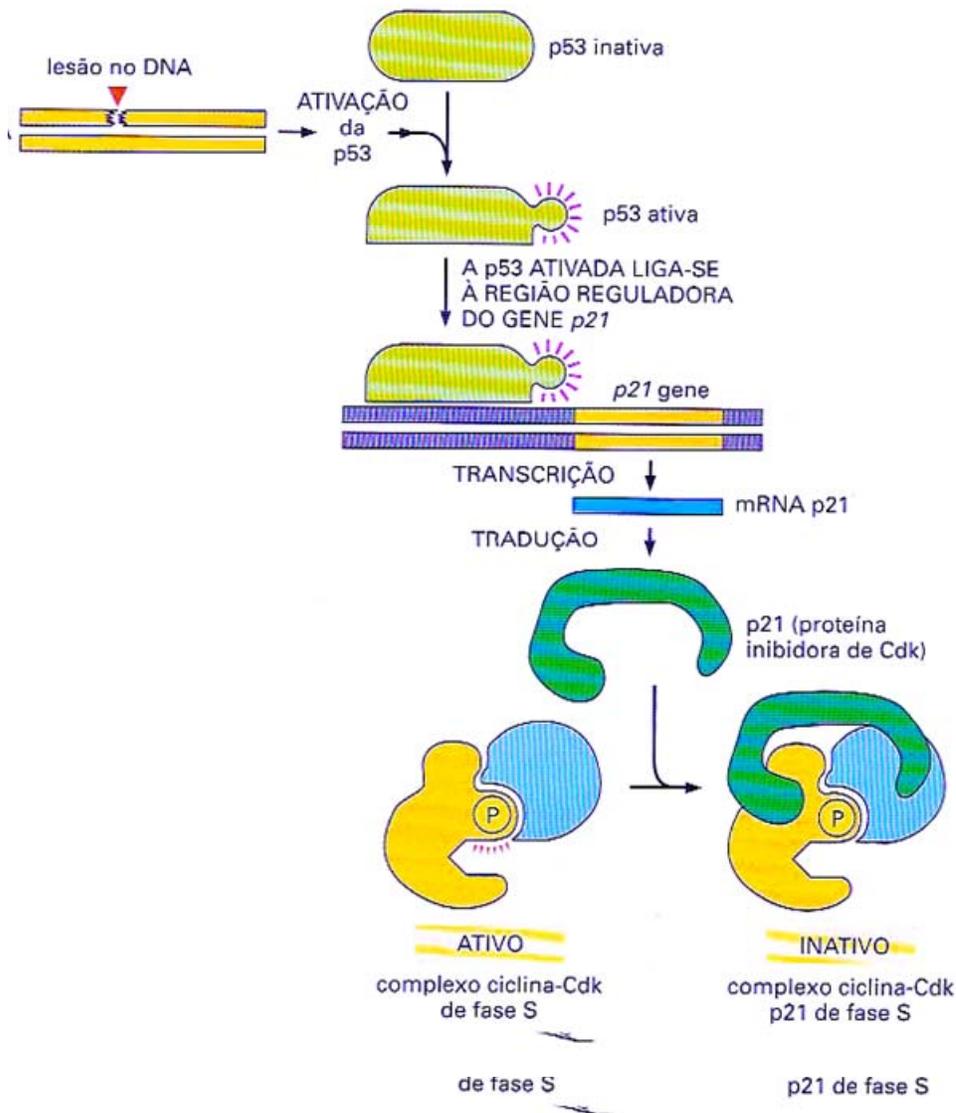


Figura 3- Ilustração mostrando como a proteína p53 retém o ciclo celular em G1. Quando o DNA está danificado, a proteína p53 aumenta e a proteína torna-se ativa. A p53 ativada estimula a transcrição do gene que codifica a proteína p21 que é o inibidor de CDK. A proteína p21 se liga ao complexo ciclina-CDK da fase S inativando-o, e assim o ciclo celular permanece estacionado em G1. O mecanismo pelo qual a lesão no DNA ativa p53 não é totalmente conhecido.

1.4.1- P53 e o ciclo celular

O ciclo celular é composto por uma seqüência ordenada de fases. A célula diferenciada se encontra em G₀, onde ela atingiu sua diferenciação terminal e está quiescente. Se a célula está destinada a proliferar, ela entra em G₁, período em que aumenta de tamanho e prepara as proteínas de que necessita para a síntese de DNA. Durante essa fase, a célula é sensível às condições ambientais. Se elas não forem favoráveis, a divisão celular pára em G₁. No entanto, se ultrapassar o ponto R (ponto de restrição), a divisão celular ocorrerá independente de condições ambientais. Na fase S sintetiza-se o DNA que será replicado durante a fase G₂. No início de G₂ existe outro ponto de controle importante, onde se verificará a qualidade do DNA replicado. Finalmente, na fase mitótica (M), o DNA duplicado será equitativamente dividido entre as duas células filhas. A mitose será impedida se, na checagem da mitose, forem constatadas anormalidades na divisão dos cromossomos (O'Neill, 2000).

A divisão celular normal é positivamente regulada ou estimulada através de vias sinalizadoras. Estas vias respondem a fatores extracelulares os quais agem por meio de uma seqüência de sinais. Por exemplo: receptores → proteína G → proteína-quinases → fatores de transcrição. A progressão pelo ciclo celular a seguir é, em parte, controlada, por uma série de proteínas chamadas "quinases dependentes de ciclinas" (CDKs), particularmente nas transições de fases, tanto de G₁ para S quanto de G₂ para M (Arnold et al., 1989). Os níveis de ciclinas oscilam durante as fases do ciclo, determinando o momento apropriado de sua ligação com as CDKs. Este grupo de enzimas, por sua vez, fosforila uma série de substratos chave que permitirão a progressão de uma fase à outra do ciclo celular (O'Neill, 2000). As ciclinas são reguladoras das subunidades das CDKs. Diferentes ciclinas se associam a diferentes CDKs, podendo associar-se a mais de uma CDK nas diferentes fases do ciclo celular. A atividade ciclina/CDK é bloqueada por uma série de inibidores específicos. Eles podem ser agrupados em famílias como a do p21/p27/p57 que bloqueia múltiplos complexos ciclina/CDKs e na família p16/p15/p18/p19 que inibe os complexos CDK4/CDK6. Alguns fatores podem parar o ciclo em G₁, como os danos causados ao DNA que, ativando o p53, induzem a produção de p21. Outros fatores podem atuar através de diferentes grupos de inibidores do ciclo, como

TGF- β que induz produção tanto de p15 como de p27. Assim, o ciclo celular é bloqueado para permitir o reparo dos danos detectados e impedir que eles se propaguem para as células filhas e dêem origem a um clone de células tumorais (O'Neill, 2000).

Outra importante função de p53 é a indução de apoptose celular. Caso os reparos não sejam possíveis por causa de um dano muito grave ao DNA, p53 induz a uma cascata de sinais que levam esta célula à morte impedindo-a de passar qualquer vantagem de crescimento para suas células filhas (Attardi, 2005).

As mutações no gene p53 podem resultar na síntese de uma proteína sem a capacidade de se ligar às regiões específicas do DNA. Ocorre então a perda do controle da proliferação celular e a perpetuação das mutações que acontecem no DNA durante a replicação (Pillai et al., 1998).

A proteína p53 selvagem tem uma meia vida curta, de forma que células tireoidianas normais não expressam p53. No entanto, a proteína p53 mutada continua dentro da célula por um longo tempo, e por isso pode ser detectada em células tumorais através da imunistoquímica. Acredita-se que o desaparecimento ou a inativação da proteína p53 seja um evento tardio na série de acontecimentos que leva a célula tireoidiana normal a se desdiferenciar (Ward e Fagin, 1998). Assim, a expressão de p53 está relacionada a carcinomas de diferenciação pobre ou a carcinomas indiferenciados, de maior agressividade e pior prognóstico (Soares et al., 1994). A expressão de p53 em carcinomas diferenciados, papilífero e folicular, têm sido relacionadas com maior agressividade dos tumores afetados (Hosal et al., 1997).

1.5- O gene mucin (MUC1)

O gene MUC1, localizado em 1q21, pertence à classe dos genes da mucina a qual é responsável pela produção do muco das mucosas de diversos tecidos do corpo humano (Figura 4). O gene MUC1 é encontrado em tecidos epiteliais e está hiper-expresso, aberrantemente glicosilado e constitutivamente fosforilado em vários tumores, incluindo os tumores da tireóide (Bieche et al. 1997; Magro et al. 2003; Wreesmann et al. 2002)

As mucinas representam uma família de 13 genes codificando glicoproteínas de alto peso molecular que são caracterizadas por uma estrutura central polimórfica de “tandem repeats” que serve como uma proteína estrutural para um grande número de glicanos O-ligantes (Williams et al., 1999; Perez-Vilar e Hill, 1999). Essas glicoproteínas únicas são típicas, senão exclusivas das células epiteliais e dos seus produtos secretórios, pela sua estreita relação com fatores de crescimento e citocinas, acredita-se que exerçam função protetora mecânica e química primária dos tecidos epiteliais e mesoteliais (Figura 5). Essa função protetora, no entanto, pode ser explorada pelas células tumorais para sua defesa contra ataque imunológico (Gimmi et al., 1996; Agrawal et al., 1998; Komatsu et al., 1999). Em muitas circunstâncias alterações na taxa de transcrição dos genes da mucina podem ser indicativas de transformação neoplásica, sugerindo que alterações na expressão da mucina podem implicar progressão para um fenótipo maligno, assim como, oferecer às células habilidade para metastatizar à distância (Bresalier et al., 1991; Ho et al., 1995; Nakamori et al., 1994; Yonezawa e Sato, 1997). A proteína MUC1 se expressa na superfície apical das células epiteliais e exhibe características de receptor de citocinas e de fatores de crescimento (Wang et al., 2004).

Em células tireoidianas normais MUC1 está presente exclusivamente na porção apical, mas nos carcinomas essa polarização é perdida e MUC1 se co-localiza com moléculas de adesão como caderinas e integrinas. O longo e rígido domínio extracelular do MUC1 envolve essas moléculas de adesão e, se presente na superfície celular com suficientemente alta densidade, reduz a adesão celular (Ligtenberg et al., 1992; Wesseling et al., 1995; Wesseling 1996). A super expressão do MUC1 tem sido freqüentemente reportada em carcinomas (Hilkens et al. 1984; Zotter et al., 1987; Zaretsky et al., 1990). Acredita-se que tenha efeito similar à perda da E-caderina, a maior molécula de adesão célula-célula epitelial, no comportamento celular, promovendo invasão e metástase (Behrens 1994; Shiozaki et al., 1996; Bracke et al., 1996). O MUC1 também pode ser um antígeno, que é mensurado no ensaio do CA 15-3, que é o maior marcador sanguíneo para detectar recorrência do câncer de mama (Dyomin et al., 2000; Gilles et al., 2000). Contudo, a causa da hiper-expressão do MUC1 nas células carcinomatosas não foi ainda estabelecida.

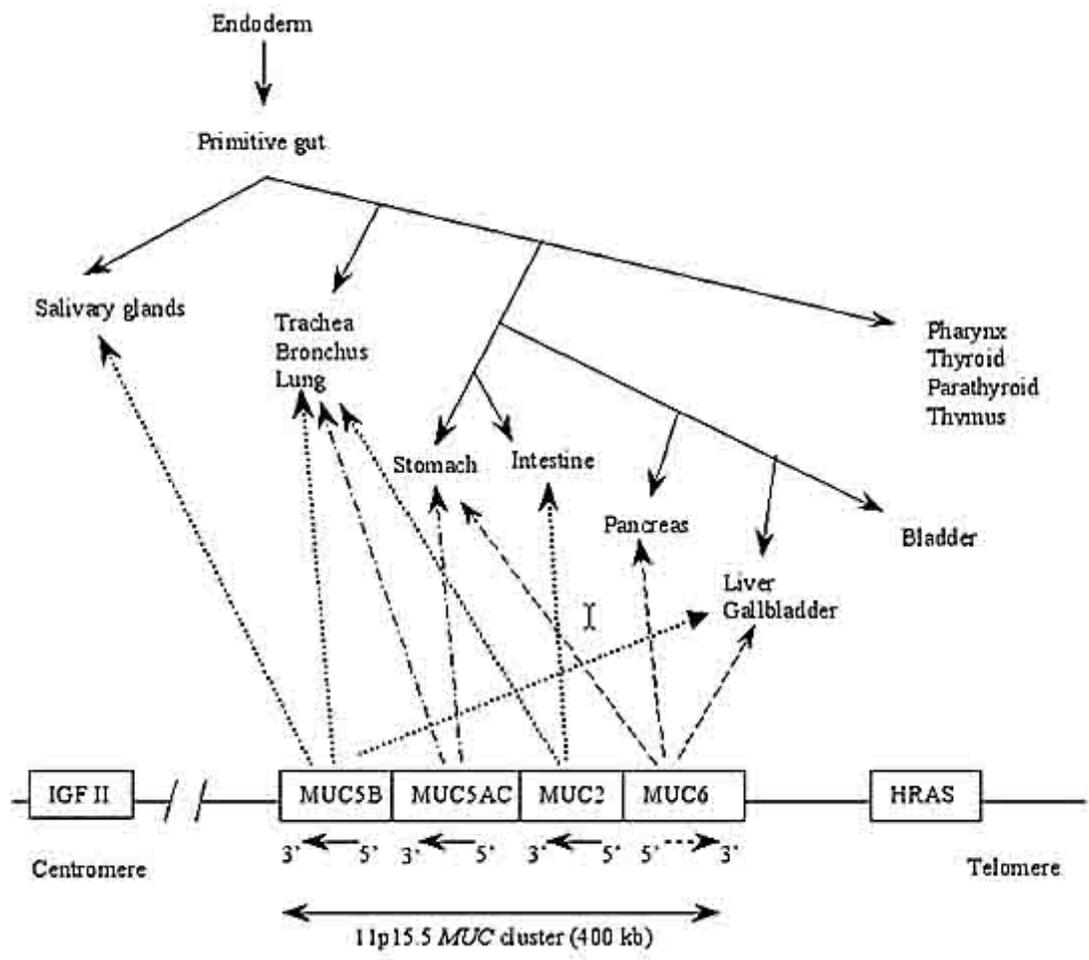


Figura 4- Correlação entre a posição dos genes MUC e sua maior expressão específica em diversos tecidos

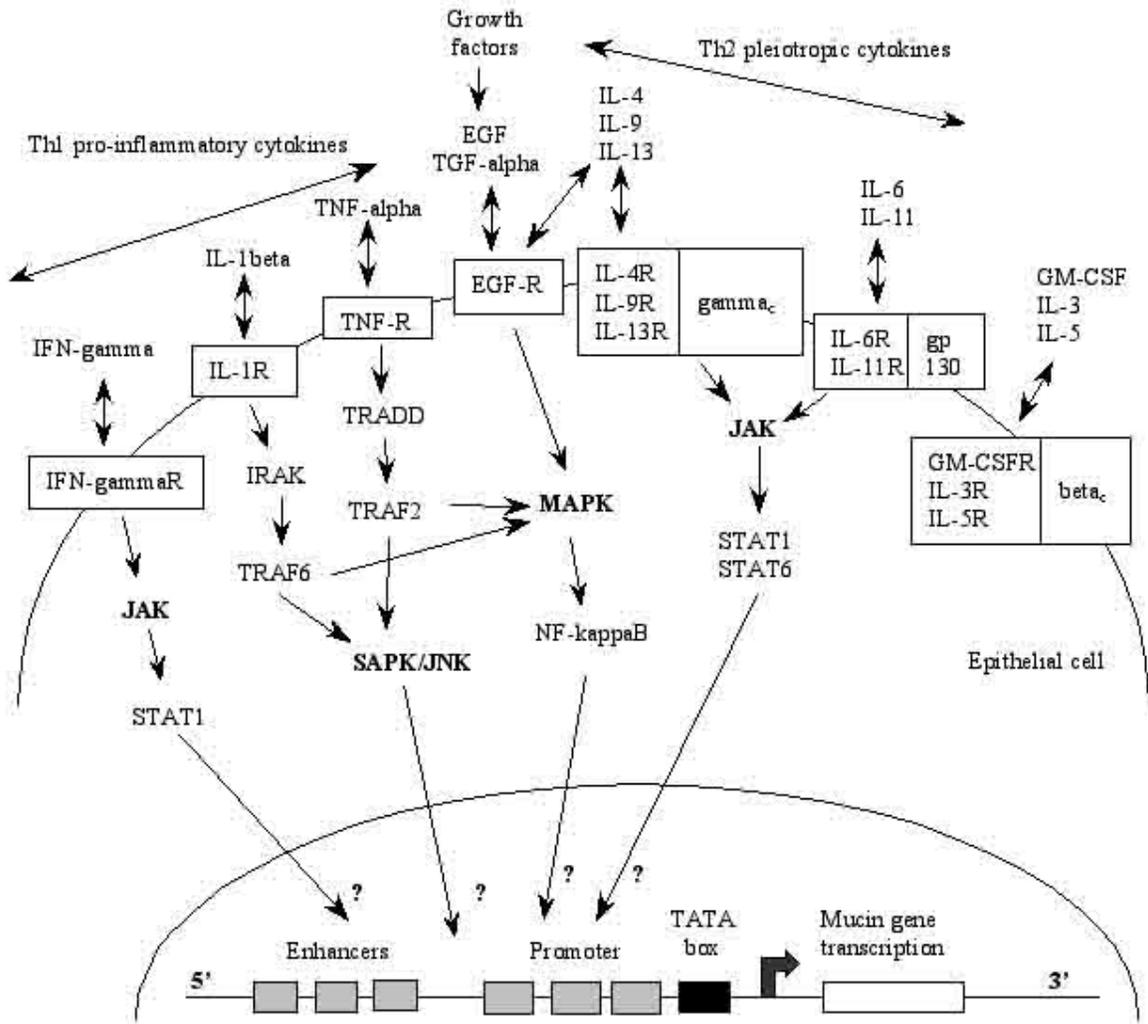


Figura 5- Mediadores (fatores de crescimento e citocinas) e o caminho da sinalização intracelular envolvendo a regulação da transcrição do gene MUC

2- OBJETIVOS

Correlacionar os achados da expressão das proteínas p53, NIS e MUC1 com o prognóstico e a sobrevida dos pacientes com carcinomas diferenciados da tireóide conforme:

- ✓ aspectos clínicos
- ✓ anatomopatológicos
- ✓ laboratoriais (imunoistoquímica)
- ✓ evolutivos

3- METODOLOGIA

3.1- Casuística

3.1.1- Pacientes

Os pacientes selecionados para este estudo foram consecutivamente atendidos na Disciplina de Endocrinologia do Hospital de Clínicas da Unicamp durante os anos de 1995 a 2006, com mediana de seguimento de 63 meses e média de 66 meses (variando de um mínimo de seis ao máximo de 123 meses), no Ambulatório de Câncer da Tireóide, sob coordenação da Profa. Dra. Ligia Vera Montalli da Assumpção. Os pacientes foram inscritos no estudo após concordarem em participar do mesmo e assinarem o Termo de Consentimento Informado, conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp. Utilizou-se tecido tireoidiano incluído em bloco de parafina proveniente de tireoidectomia de 67 pacientes. Destes, havia dez com nódulos tireoidianos benignos (oito eram do sexo feminino e dois do sexo masculino, nove brancos e um não-branco) e 57 com nódulos malignos (21 carcinomas papilíferos clássicos, 7 carcinomas papilíferos variante de células altas, 6 carcinomas papilíferos variante folicular, 16 carcinomas foliculares, 4 carcinomas medulares e 3 carcinomas anaplásicos). Destes, 48 eram do sexo feminino e 9 do sexo masculino, 43 brancos e 14 não-brancos. A idade ao diagnóstico variou de 15 a 77 anos, com mediana de 45 anos e média de $44,92 \pm 18,02$ anos (Tabela 1).

Tabela 1- Resumo dos dados clínicos dos pacientes estudados

	IDADE	SEXO		COR	
	Média ±	F	M	B	NB
	Desvio padrão				
Carcinoma Papilífero	39,88±16,5	31	3	26	8
Carcinoma Folicular	54,78±16,32	13	3	13	3
Carcinoma Anaplásico	42,21±15,32	2	1	1	2
Carcinoma Medular	70±5,65	2	2	3	1
Benignos	41,56±16,7	8	2	9	1

As lâminas foram revisadas pela Profa. Dra. Patrícia Sabino Matos do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/Unicamp para a confirmação de todos os diagnósticos dos pacientes.

Todos os pacientes portadores de carcinoma de tireóide foram acompanhados no Ambulatório de Câncer da Tireóide implantado há mais de 25 anos, segundo um protocolo do qual constam, além dos dados de identificação, a idade ao diagnóstico, sexo, cor, dados clínicos pré-cirúrgicos, exames realizados (ultra-som, cintilografia da tireóide, biópsia aspirativa), dados referentes à cirurgia e dados do exame anatomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação, presença de linfonodos metastáticos). Nenhum dos pacientes incluídos neste estudo possuía história de exposição accidental ou médica à radiação ionizante. Todos os dados, incluindo os diagnósticos de outras patologias concomitantes, foram confirmados nos prontuários dos pacientes.

Todos os indivíduos encaminhados ao Ambulatório de Câncer da Tireóide com diagnóstico de carcinoma da tireóide ou a suspeita do mesmo na citologia da punção aspirativa realizada com agulha fina são tratados de acordo com um protocolo. Nos pacientes em que o diagnóstico histopatológico era de nódulos não se aplicou o protocolo de acompanhamento clínico.

De acordo com esse protocolo, todos os pacientes são submetidos à tireoidectomia total ou subtotal. Os pacientes com diagnóstico pré-operatório de nódulos metastáticos no pescoço ou nos quais gânglios suspeitos são visualmente identificados no intra-operatório são submetidos à dissecação regional do pescoço. O material da cirurgia é incluído em parafina e examinado pelos anatomopatologistas, que classificam o tipo histológico do câncer de acordo com os parâmetros propostos por LiVolsi, 1990.

3.1.2- Seguimento

Depois de quatro a seis semanas da cirurgia, os pacientes foram mantidos sem reposição de levotiroxina foram submetidos à PCI com 5 mCi de iodeto-¹³¹I para a detecção de restos locais ou metástases do carcinoma. Todos os pacientes recebem dose ablativa de

cerca de 100 mCi de radiodo ^{131}I , após a qual é realizada nova PCI. Em seguida, são prescritas doses supressivas de levotiroxina para manter os níveis de TSH suprimido. Cerca de seis meses após a cirurgia, estes pacientes são revistos e pede-se dosagem de Tg sérica.

Todos os pacientes com câncer são seguidos com exames periódicos para a detecção precoce de metástases, TSH sérico e Tg medidos de acordo com a rotina do protocolo de seguimento que inclui raios-X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada e outros eventuais procedimentos para a detecção de metástases à distância.

Cerca de um ano após a cirurgia, todos os pacientes são submetidos a uma nova PCI, desta vez após suspensão da levotiroxina, acompanhada de nova dosagem de Tg e TSH. Na suspeita de qualquer lesão recidivante ou na presença de níveis de Tg sérica elevados ($>2\text{mg/dl}$), os pacientes são amplamente investigados por meio dos métodos de imagem que forem mais apropriados de acordo com a suspeita clínica.

Definiu-se a evolução como "livre de doença" em indivíduos que mantêm níveis de Tg abaixo de 1 ng/dL e não possuem qualquer evidência de recorrência clínica ou por métodos de imagem, enquanto os pacientes com recorrência são divididos naqueles com "recorrência local", quando se detectam restos tireoidianos ou recidivas no leito tireoidiano ou gânglios cervicais, e naqueles com "metástases" na presença de metástases à distância.

Para fim de análise estatística, os pacientes que evoluíram com recidiva local ou à distância ou morreram durante o acompanhamento foram classificados como de má evolução. Em contraste, os pacientes sem evidência de doença durante o seguimento foram classificados como de boa evolução.

3.1.3- Estadiamento

O estágio e o grau de diferenciação dos tumores foram definidos pelos dados anatomopatológicos obtidos do material cirúrgico. O estadiamento tumoral foi baseado no estadiamento clínico Ohio State University (Mazzaferrri e Jhiang, 1994). Esta classificação se baseia no clássico método do TNM, isto é, no tamanho do tumor (T), acometimento de

nódulos cervicais (N) e metástases à distância (M), mas leva em conta a idade, classificando de forma diferente os pacientes abaixo e acima dos 45 anos. Esta classificação considera no estadio 1 os pacientes em que o tumor é de foco único ou múltiplo mas restrito à tireóide; estadio 2 aqueles em que o tumor apresenta acometimento restrito a gânglios cervicais; no estadio 3 o tumor apresenta metástases restritas à região cervical; no estadio 4 o tumor apresenta metástases à distância. A Tabela 2 mostra como esta classificação qualifica os pacientes com câncer da tireóide.

Tabela 2- Características anatomopatológicas dos casos com TNM, estadio, Tg e evolução sem doença aparente (boa) e com doença aparente ou óbito (ruim), dos pacientes com CDT de tipo papilífero (CP) e folicular (CF)

	TNM								ESTADIO				TG			EVOLUÇÃO	
	T1	T2	T3	T4	N0	N1	M0	M1	I	II	III	IV	<2	2-5	>5	Boa	Ruim
CP	2	17	2	13	14	19	31	2	1	17	12	3	26	4	2	24	9
CF	0	4	4	8	13	1	7	7	1	4	2	7	6	0	8	6	10

3.2- Métodos

Os blocos de parafina foram recuperados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) - Unicamp.

Todos os blocos de parafina contendo material de tireóide previamente fixados em formol a 10% foram processados no Laboratório de Patologia do HC / FCM - Unicamp. Os blocos de parafina foram recortados e as lâminas foram confeccionadas e coradas em hematoxilina e eosina (HE). Estas lâminas foram analisadas pelo mesmo médico patologista do projeto (Profa. Dra. Patrícia Sabino Matos) para confirmação do diagnóstico anteriormente expedido, análise de parâmetros como número de nódulos na glândula, seu volume total e grau de invasão, além da classificação do subtipo histológico.

3.2.1- Técnica da imunistoquímica

Silanização das lâminas: as lâminas foram lavadas, em seguida deixadas no álcool absoluto, foram imersas duas vezes em acetona por 1 minuto, depois passaram por uma solução de acetona (750 ml) com silano (30 ml), novamente colocadas em acetona pura e foram deixadas na estufa 110°C para secar. Para cada caso, do bloco que apresentava material mais representativo, foram feitos cortes de 4µm de espessura e colocados em lâminas previamente tratadas. As lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 110°C durante uma hora para fixação das secções nas lâminas. Em seguida, foram retiradas e mantidas à temperatura ambiente por uma hora até o momento da reação. A reação de imunoperoxidase foi realizada no Laboratório de Patologia Experimental – CAISM – Unicamp.

Os anticorpos primários utilizados foram:

Proteína p53: anticorpo monoclonal, produzido de camundongo, DAKO (Dinamarca) código M7001, clone DO-7, diluição 1:100. Epítopo na porção N-terminal, proteína de 53 kDa.

Proteína MUC1: anticorpo monoclonal, produzido de camundongo, Santa Cruz (Califórnia-USA) VU4H5: sc-7313, diluição 1:500. Proteína varia de 160 a 230 kDa.

Proteína NIS: anticorpo policlonal, produzido de coelho, diluição 1:500. Gentilmente doado pela Dra. Sissy Jhiang do Goss Laboratory em Columbus, Ohio – Ohio State University.

As diluições dos anticorpos foram realizadas com soro albumina bovina (BSA).

3.2.2- Reação da imunoperoxidase

Os cortes foram desparafinados em banho de xilol a 110°C e, a seguir, banhos subsequentes em xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%,

80%, 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de água oxigenada a 10 volumes cada um, com duração de três minutos, seguidas de lavagem em PBS (solução salina tamponada com fosfato ph 7,4 a 7,6). Para a recuperação antigênica foi utilizada panela a vapor T-fall^R (França), com o objetivo de desmascarar antígenos. Na panela as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio (10mM) ph 6,0 a 95°C (NIS e MUC) e tampão tris-EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM) ph 8,9 (p53), durante 30 minutos. A seguir foram lavadas em água corrente. Após esta etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico a 4°C, durante a noite. Após a incubação, as lâminas foram passadas por três lavagens em PBS sob agitação, secadas e incubadas com DAKO Envision+, peroxidase K4001 anti-camundongo para p53 a 37°C durante uma hora; DAKO Envision K1491, anti-camundongo e anti-coelho para NIS a 37°C durante uma hora e DAKO Labelled Streptavidin-Biotin LSAB K675 para MUC1 a 37°C durante meia hora com a Avidina e meia hora com Biotina. A seguir, três lavagens em PBS com agitação. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (3-3' – diaminobenzidine tetrahydrochloride, SIGMA (St. Louis – USA) código D5637) na proporção de 60mg para 100ml de PBS, 1500 µl de água oxigenada a 10 volumes e 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C, durante cinco minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra coradas com hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizadas em três banhos de xilol e a seguir montadas com lamínulas e resina Entellan (Merck 1079610100). Para atestar a positividade da reação imunoistoquímica, foram usados controles sabidamente positivos. O controle positivo para p53 foi obtido de um carcinoma de mama, fortemente positivo. Para MUC1 o controle positivo foi obtido de um carcinoma de tireóide e para NIS o controle positivo foi retirado de uma doença de Graves (bloco B7517/05). O controle negativo foi obtido dos mesmos blocos usados no controle positivo com a supressão do anticorpo primário.

3.2.3- Leitura dos resultados

Foi realizada em microscópio óptico comum, no aumento de 40 vezes pela autora e revista por um único médico anatomopatologista (Profa. Dra. Patrícia Sabino Matos), de modo semi-objetivo, examinando-se todos os campos de todos os fragmentos do tumor. Foram fotografados os campos das lâminas onde se observou maior positividade “hot spot” (4 fotos cada). As lâminas foram fotografadas em uma câmera Canon modelo Power Shot G5 de 5 mega pixels. O microscópio utilizado foi modelo Axiophot da marca Zeiss em um aumento de 40x (objetiva).

Para o estudo de p53 considerou-se todos os núcleos celulares corados em marrom, independente da sua intensidade, e foram contados os núcleos de 500 células. O ponto de corte de positividade considerado foi: 0 (negativo); 1+ (até 10% das células coradas); 2+ (10-50% das células coradas); 3+ (> 50% das células coradas).

Para MUC1 considerou-se positivos todos os casos de citoplasmas corados em marrom que variou com a intensidade: forte, moderada e fraca. A positividade foi intensa em alguns casos e focal em outros, variando bastante em todos os tecidos.

As lâminas de NIS tiveram uma positividade focal de membrana e citoplasmática na cor marrom. Considerou-se positivas todas as lâminas com alguma expressão, independente da localização e da intensidade.

4- RESULTADOS

Entre os 67 casos estudados, havia 34 (50,74% dos casos) com diagnóstico de carcinoma papilífero, sendo 21 (31,3%) do tipo clássico, 7 (10,4%) da variante de células altas e 6 (9%) da variante folicular. Havia ainda 16 (23,9%) carcinomas foliculares, 4 (6%) medulares e 3 anaplásicos (4,5%). Dez (14,9%) pacientes eram portadores de tireoidopatias benignas (3 casos de bócio hiperplásico nodular, 4 adenomas foliculares, 1 tireoidite de Hashimoto e 2 tecidos normais).

Os pacientes foram seguidos em média por 66 ± 28 meses (mediana de 63 meses, isto é, de cinco anos), variando de um mínimo de 6 meses até 123 meses (10 anos). Definiu-se o prognóstico como bom para os 31 pacientes que evoluíram sem evidência de doença ativa, caracterizando este grupo por níveis de Tg abaixo de 2ng/dL, ausência de queixas ou imagens suspeitas de recidiva local ou à distância durante o período de acompanhamento. Definiu-se como pertencentes ao grupo de má evolução ou de mau prognóstico os 19 pacientes que apresentavam evidência de recidiva local ou à distância ou que evoluíram para óbito durante o acompanhamento. Infelizmente não possuímos dados clínicos dos pacientes com carcinoma anaplásico e carcinoma medular que, portanto, não foram incluídos na análise estatística referente à evolução. Foram utilizados apenas na análise comparativa das imagens imunoistoquímicas. Durante o período de seguimento, 6 pacientes morreram da doença, sendo: 2 carcinomas papilíferos clássicos, 2 carcinomas foliculares, 1 carcinoma medular e 1 carcinoma anaplásico.

A idade média ao diagnóstico dos pacientes foi de $44,92\pm 18,02$ anos, variando de 15 a 77 anos de idade. A idade média dos pacientes que evoluiu sem evidência de doença foi de $41,70\pm 15,70$ anos enquanto os de má evolução tinham idade média de $51,52\pm 19,74$ anos (teste t de student; $p=0,0578$). A maior parte dos pacientes era do sexo feminino (48 casos), havendo apenas 9 homens, também não havendo diferença entre o sexo no grupo de má evolução (16 mulheres e 3 homens) e o de boa evolução (29 mulheres e 2 homens) (Fisher; $p=0,355$). Em relação à cor, a maioria dos pacientes era da cor branca (78,4%) com apenas 11 casos (21,6%) de não-brancos, não havendo diferença entre o grupo que evoluiu mal (15 brancos e 4 não-brancos) e o que evoluiu bem (24 brancos e 7 não-brancos) (Fisher; $p=1$). As características anatomopatológicas dos casos estão resumidas na Tabela 2.

Não houve diferença entre o grupo de boa evolução e o de má evolução em relação ao acometimento unifocal (respectivamente 35,71% e 38,89% dos casos) ou multifocal (respectivamente 61,11% e 64,29% dos casos) (Fisher; p=1) da glândula pela neoplasia. Também não observou-se associação entre evolução e o grau de invasão (restrito à glândula, invadindo a cápsula ou tecido extra-tireoidiano (Fisher; p=0.195).

No entanto, 77% dos casos de boa evolução apresentavam grau I de diferenciação (bem diferenciado) enquanto 73% dos casos com grau 2 (moderadamente diferenciado) e 3 (pouco diferenciado) evoluíram mal (Fisher; p=0,009) como mostra a Tabela 3. O tamanho do tumor também se correlacionou com a evolução (Fisher; p=0,024), como mostra a Tabela 4.

Tabela 3- Comparação do grau de diferenciação (I- Bem diferenciado; II- Moderadamente diferenciado; III- Pouco diferenciado) com a evolução dos pacientes boa (sem doença aparente) e ruim (com doença aparente ou óbito)

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO	EVOLUÇÃO		TOTAL
	RUIM %	BOA %	
I- Bem diferenciado	4 (26.67)	10 (76.92)	14
II- Moderadamente diferenciado	6 (40.0)	3 (23.08)	9
III- Pouco diferenciado	5 (33.33)	0	5
TOTAL	15	13	28

Da mesma forma, houve forte associação entre evolução e detecção de metástases à distancia, representadas na Tabela 4, de forma que 100% dos casos M0 evoluíram bem, enquanto 56% dos casos com metástases ao diagnóstico evoluíram mal (Fisher; p<0.001).

Tabela 4- Comparação do estadiamento TNM (T-tamanho do nódulo, N-acometimento linfonodal e M-metástase à distância) com a evolução dos pacientes boa (sem doença aparente) e ruim (com doença aparente ou óbito)

	ESTADIAMENTO TNM	EVOLUÇÃO		TOTAL
		RUIM %	BOA %	
T	T1	1 (5.26)	2 (6.45)	3
	T2	3 (15.79)	17 (54.84)	20
	T3	3 (15.79)	3 (9.68)	6
	T4	12 (63.16)	9 (29.03)	21
	TOTAL	19	31	50
N	N0	10 (55.56)	17 (54.84)	27
	N1	7 (38.89)	14 (45.16)	21
	NX	1 (5.56)	0	1
TOTAL	18	31	49	
M	M0	8 (44.44)	31 (100)	39
	M1	10 (55.56)	0	10
	TOTAL	18	31	49

A curva de Kaplan-Meier para probabilidade estimada de sobrevida, representada na figura 6, confirma que os pacientes com metástases têm sobrevida menor que os demais (Log-Rank; $X^2=11,77$; $p=0.0006$).

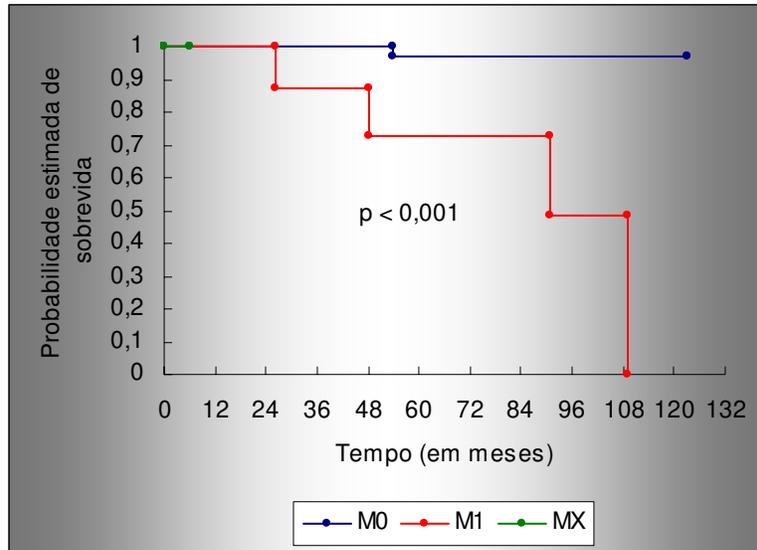


Figura 6- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier representando a probabilidade estimada de sobrevida em pacientes com presença de metástases (M1) ou ausência de metástases (M0).

Igualmente encontrou-se associação entre prognóstico e o estadio ao diagnóstico, representado na Tabela 5. Entre os indivíduos de estágio II, 63% evoluíram bem, ao passo que quase 53% dos indivíduos de estágio IV evoluíram mal (Fisher; $p < 0,001$). No entanto, o acometimento linfonodal, mostrado na Tabela 4, não influenciou o prognóstico dos casos avaliados (Fisher; $p = 0,601$).

Tabela 5- Correlação entre o estadio da doença ao diagnóstico com a evolução boa (sem doença aparente) e ruim (doença aparente ou óbito)

ESTADIO	EVOLUÇÃO		TOTAL
	RUIM	BOA	
I	1 (5.88 %)	1 (3.33 %)	2
II	2 (11.76 %)	19 (63.33 %)	21
III	5 (29.41 %)	9 (30 %)	14
IV	9 (52.94 %)	1 (3.33%)	10
TOTAL	17	30	47

4.1- Imunoistoquímica para p53

A proteína p53 foi localizada na região do núcleo de células foliculares (Figuras 9 e 10). Como controle positivo usamos a expressão de p53 em câncer de mama (figura 7). Houve clara distinção entre positividade para p53 (Figuras 9 e 10) e negatividade (Figura 8). Embora pudéssemos sub classificar os casos de acordo com a positividade (0, 1+, 2+, 3+) preferimos nos reportar apenas a casos negativos e positivos (1+, 2+, 3+) em virtude do pequeno de número de lâminas. A expressão de p53 foi identificada em 35/67 (52,2 %) dos casos como mostra a Tabela 6. Apresentaram expressão positiva 24/34 (70,6%), sendo positivos 5/6 CPVF, 6/7 dos CPVA e 13/21 CP clássico, como mostra a Tabela 6. Também expressaram p53 6/16 CF (37,5 %) e 2/3 CA. O pequeno número de amostras provavelmente seja o responsável pela ausência de qualquer correlação estatística entre positividade e estadio, tamanho tumoral, presença de metástases à distância e evolução boa ou má. A expressão de p53 também foi positiva 3/10 (30 %) dos tecidos não malignos.

Tabela 6- Resultados de imunoistoquímica para p53 em carcinoma papilífero: clássico, variante de células altas (CPVA) e variante folicular (CPVF); carcinoma folicular; carcinoma anaplásico; carcinoma medular e tireoidopatias benignas

IHQ p53	Carcinoma Papilífero			Carcinoma Folicular	Carcinoma Anaplásico	Carcinoma Medular	Benignos	Total
	Clássico	CPVA	CPVF					
Positivo	13	6	5	6	2	0	3	35
Negativo	8	1	1	10	1	4	7	32
Total	21	7	6	16	3	4	10	67

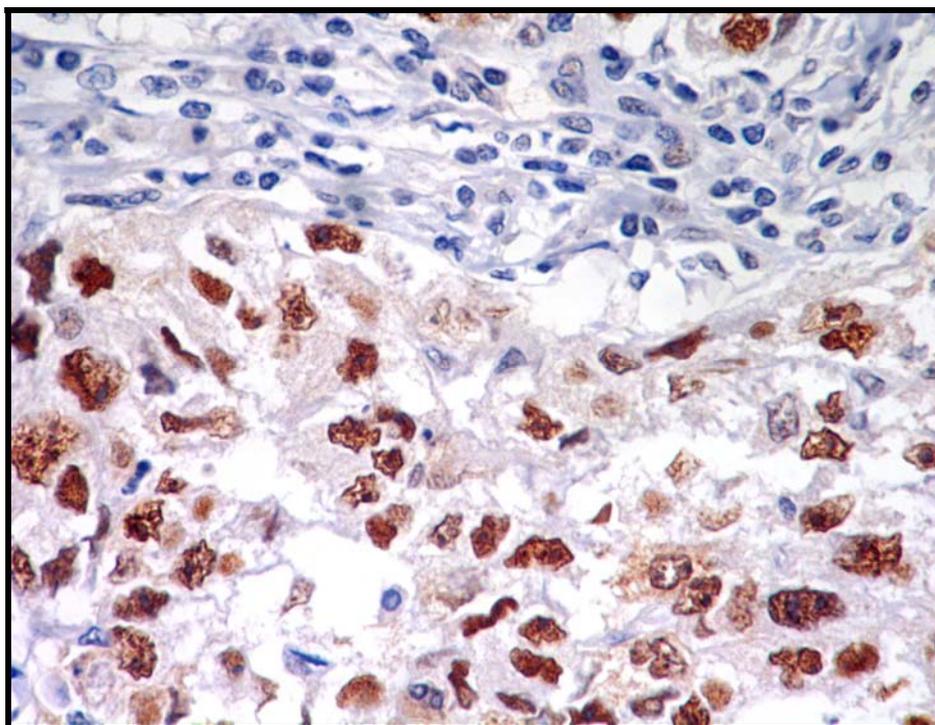


Figura 7- Carcinoma de mama: expressão nuclear da proteína p53 (abaixo) pela técnica de imunoistoquímica, utilizado como controle positivo (3+) em nossas amostras. Células inflamatórias do estroma peri-neoplásico (acima) não estão imuno-marcadas (aumento original x 400)

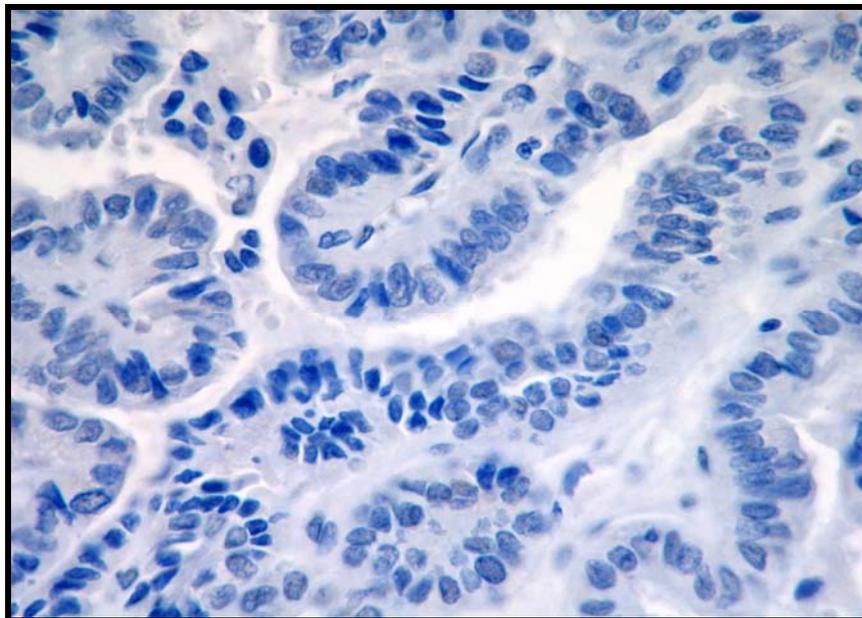


Figura 8- Carcinoma papilífero da tireóide: ausência da expressão da proteína p53 (0) pela técnica de imunohistoquímica (aumento original x 400)

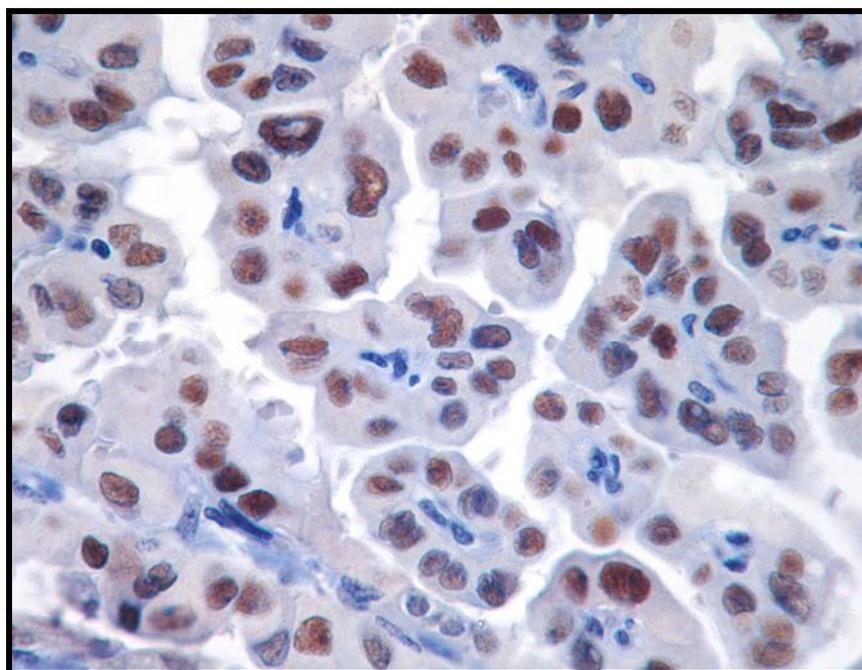


Figura 9- Carcinoma papilífero variante de células altas da tireóide: expressão nuclear da proteína p53 (3+) com positividade difusa pela técnica de imunohistoquímica (aumento original x 400)

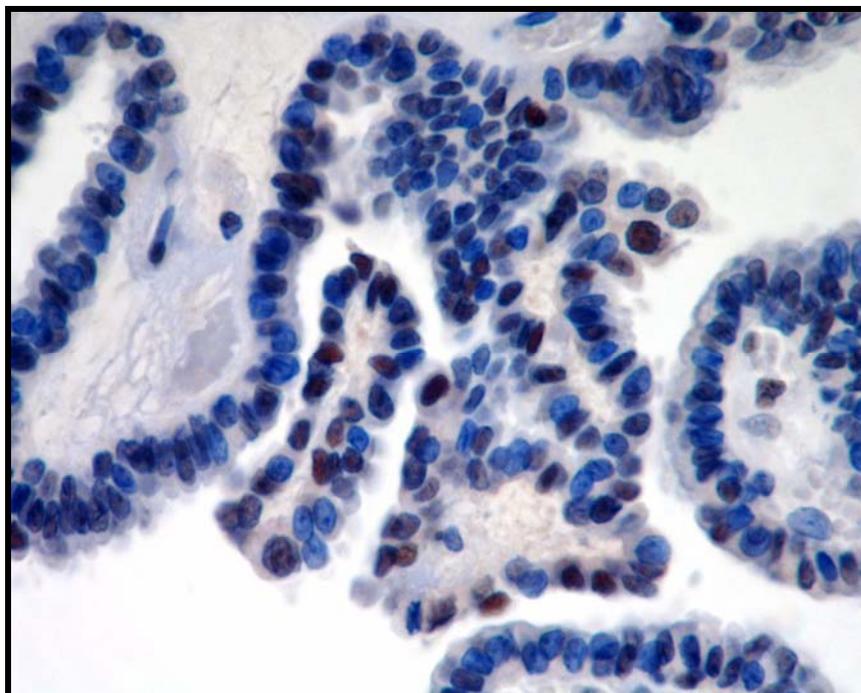


Figura 10- Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão nuclear da proteína p53 (2+) (marrom) e a ausência da expressão da proteína p53 (azul) pela técnica de imunohistoquímica (aumento original x 200)

4.2- Imunoistoquímica para MUC1

A proteína MUC1 foi identificada-se no citoplasma de células foliculares. Alguns casos apresentaram positividade intensa, difusa e evidente (Figuras 11 e 13), outras, positividade moderada (Figura 15) ou fraca (Figura 16). No entanto, a distinção entre casos positivos e negativos (Figura 12) foi sempre evidente. Assim também a presença de áreas positivas focais era indubitável (Figura 14). Em razão do pequeno número de casos estudados, eles foram agrupados apenas em positivos e negativos para análise. Considerou-se positivos para MUC1 39/67 (58,2 %) dos casos como mostra a Tabela 7. Dentre os 34 CP, 25 foram positivos (73,5 %), sendo: 3/6 CPVF e 6/7 CPVA e 16/21 CP clássico; 7/16 (43,7) CF; 2/3 CA; 3/4 CM e 2/10 tecidos benignos foram igualmente positivos (20 %). MUC1 foi semelhante ao p53, pois também não teve sua positividade correlacionada com outros parâmetros de agressividade tumoral, como tamanho, estadio, presença de metástases e com a evolução dos pacientes.

Tabela 7- Resultados de imunoistoquímica para MUC1 em carcinoma papilífero: clássico, variante de células altas (CPVA) e variante folicular (CPVF); carcinoma folicular; carcinoma anaplásico; carcinoma medular e tireoidopatias benignas

IHQ MUC1	Carcinoma Papilífero			Carcinoma Folicular	Carcinoma Anaplásico	Carcinoma Medular	Benignos	Total
	Clássico	CPVA	CPVF					
Positivo	16	6	3	7	2	3	2	39
Negativo	5	1	3	9	1	1	8	28
Total	21	7	6	16	3	4	10	67

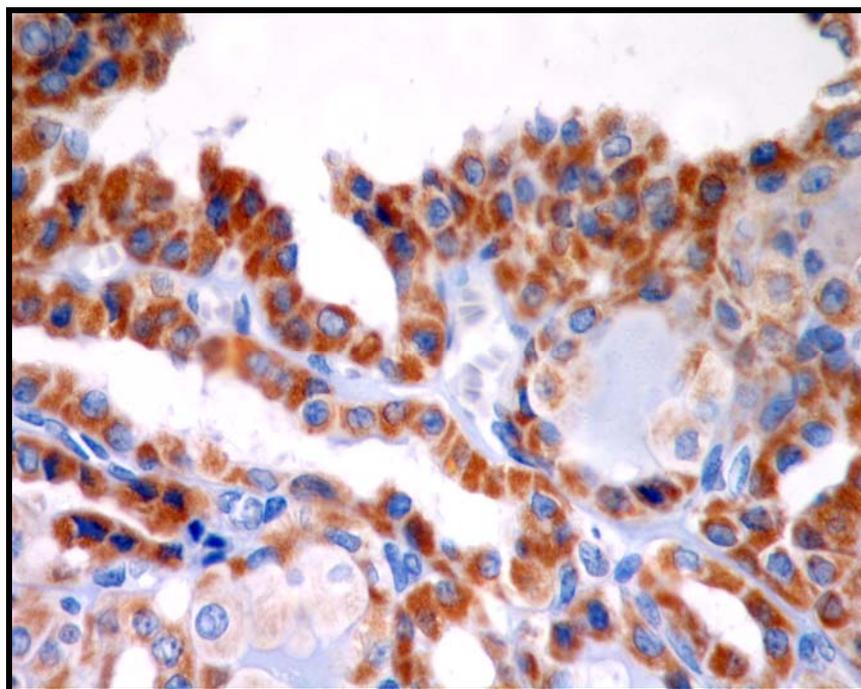


Figura 11- Carcinoma papilífero variante de células altas da tireóide: expressão citoplasmática intensa e difusa da proteína MUC1 (marrom) pela técnica de imunoistoquímica (aumento original x 400)

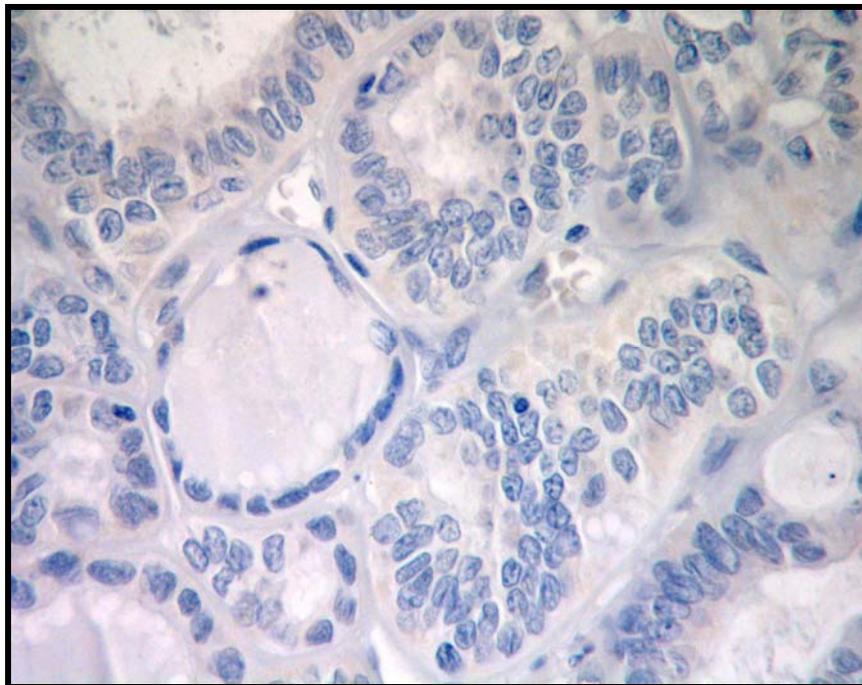


Figura 12- Carcinoma papilífero clássico da tireóide: ausência da expressão da proteína MUC1 pela técnica de imunoistoquímica (aumento original x 400)

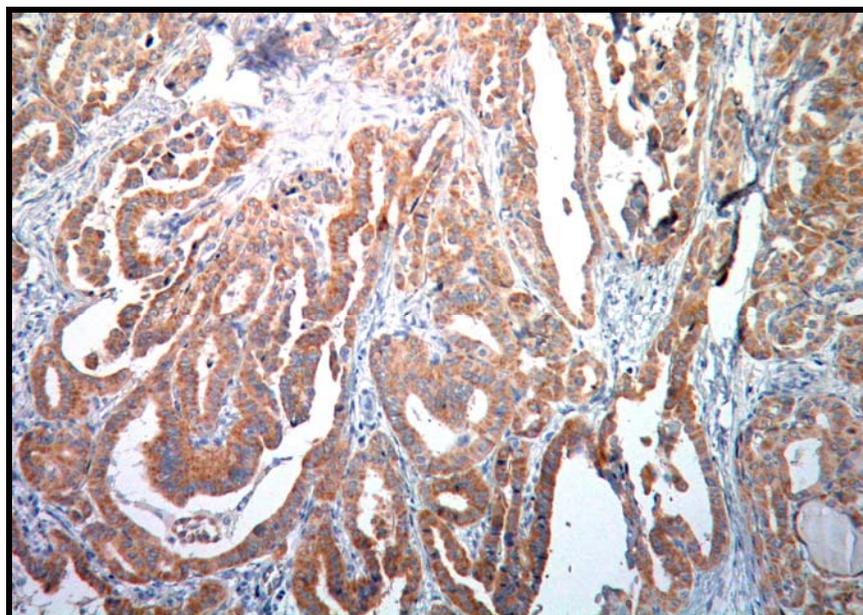


Figura 13- Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão intensa e difusa citoplasmática da proteína MUC1 (marrom) pela técnica de imunoistoquímica (aumento original x 200)

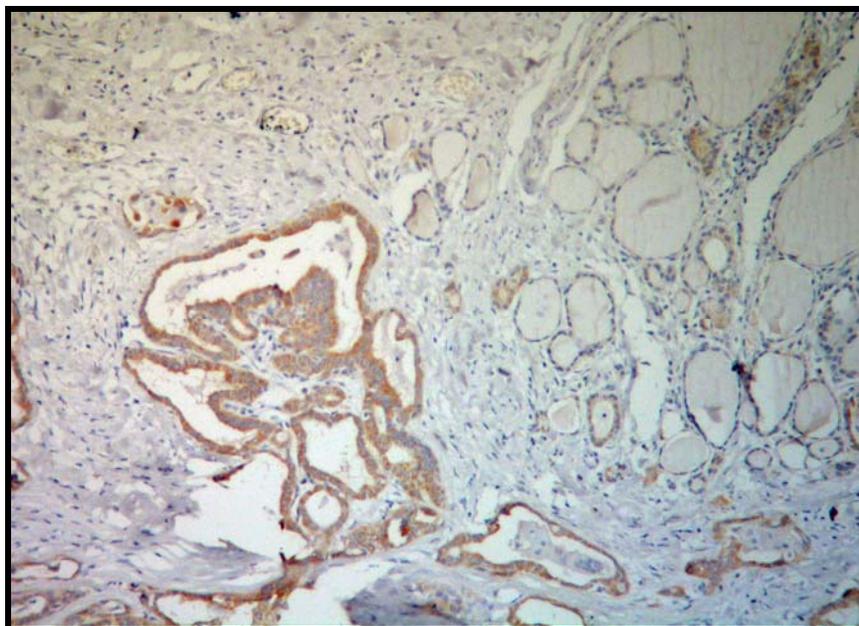


Figura 14- Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão citoplasmática da proteína MUC1 ao lado esquerdo (marrom) e ao lado direito negatividade no parênquima tireoidiano adjacente pela técnica de imunohistoquímica, (aumento original x 200)

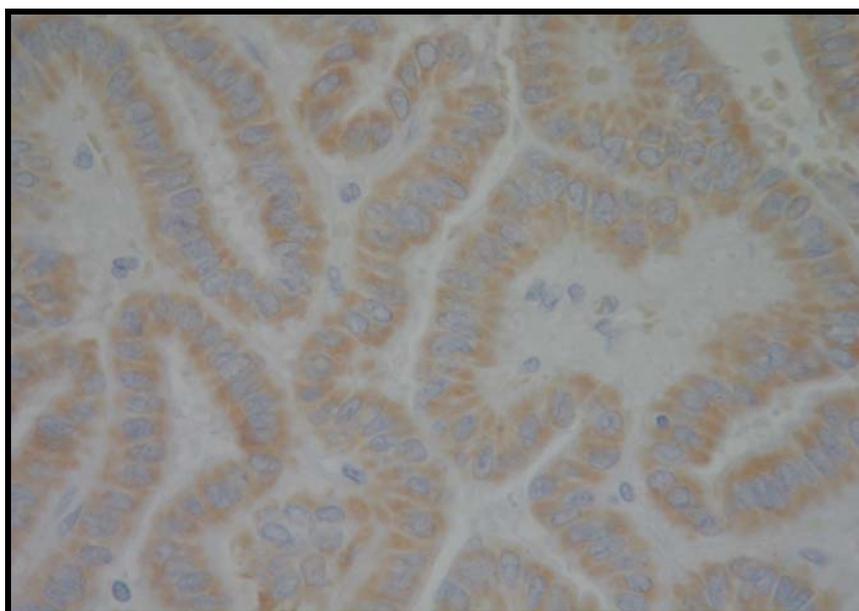


Figura 15- Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão citoplasmática difusa da proteína MUC1 (marrom) pela técnica de imunohistoquímica com positividade moderada (aumento original x 400)

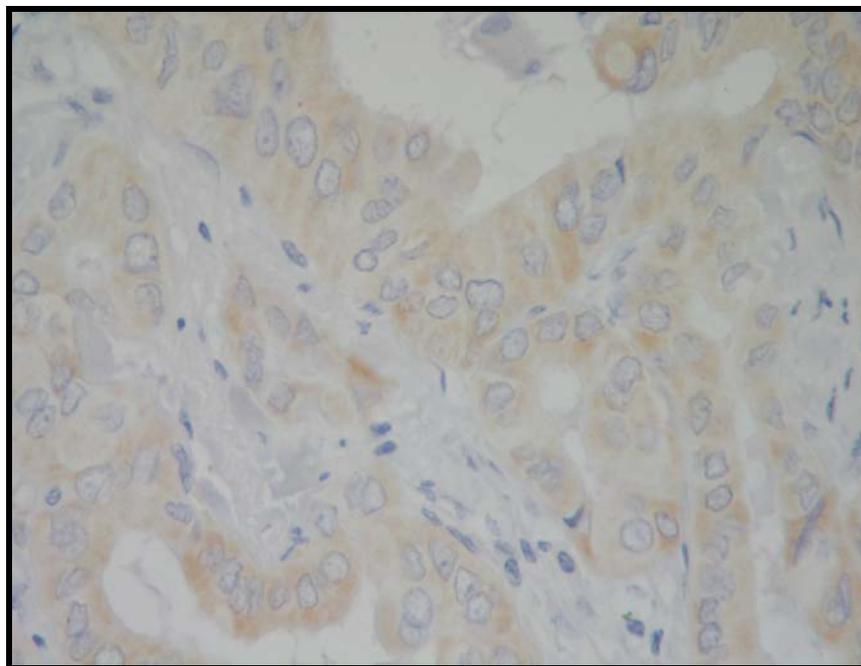


Figura 16- Carcinoma papilífero variante de células altas da tireóide: expressão citoplasmática difusa da proteína MUC1 (marrom) pela técnica de imunoistoquímica com positividade fraca (aumento original x 400)

4.3- Imunoistoquímica de NIS

A proteína NIS foi identificada em 10/67 casos estudados (14,9 %) como mostra a Tabela 8. NIS foi claramente identificada na membrana baso lateral das células foliculares, mas também apareceu no citoplasma das amostras positivas (Figuras 17, 18 e 20). Utilizou-se a positividade evidenciada em um caso de Basedow Graves como controle de expressão (Figuras 17 e 18). A diferença entre casos positivos e negativos foi evidente (Figura 19). Positividade de NIS foi evidenciada em 4/21 CP clássico (19 %), 1/7 CPVA e 1/6 CPVF, em nenhum dos carcinomas anaplásicos e medulares. Dois casos de 10 benignos também foram positivos para NIS (20 %). Novamente, a semelhança observada em relação à expressão de p53 e MUC1, a expressão do NIS não se correlaciona com estadios ou tamanho do tumor, com a presença de metástases ou com a evolução dos pacientes.

Tabela 8- Resultados de imunistoquímica para NIS em carcinoma papilífero: clássico, variante de células altas (CPVA) e variante folicular (CPVF); carcinoma folicular; anaplásico; carcinoma medular e tiroidopatias benignas

IHQ NIS	Carcinoma Papilífero			Carcinoma Folicular	Carcinoma Anaplásico	Carcinoma Medular	Benignos	Total
	Clássico	CPVA	CPVF					
Positivo	4	1	1	2	0	0	2	10
Negativo	17	6	5	14	3	4	8	57
Total	21	7	6	16	3	4	10	67

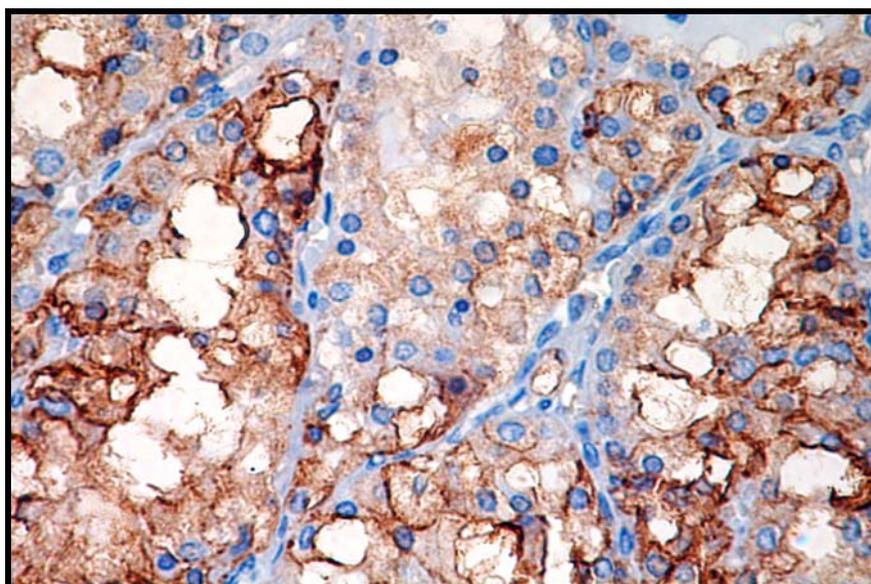


Figura 17- Doença de Graves: expressão de membrana intensa e difusa da proteína NIS pela técnica de imunistoquímica, utilizada como controle positivo em nossas amostras (aumento original x 400)

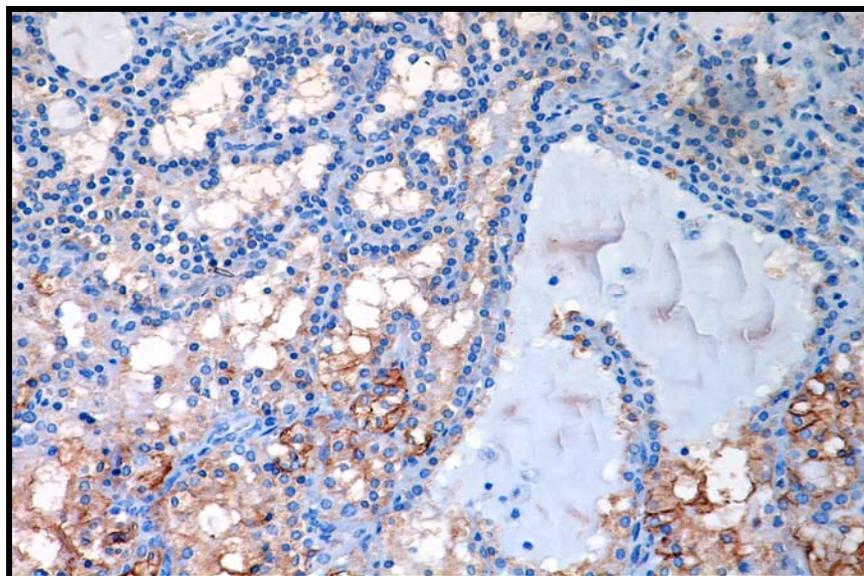


Figura 18- Doença de Graves: expressão intensa e focal de membrana e de citoplasma da proteína NIS (marrom) e em azul o núcleo celular pela técnica de imunohistoquímica (aumento original x 200)

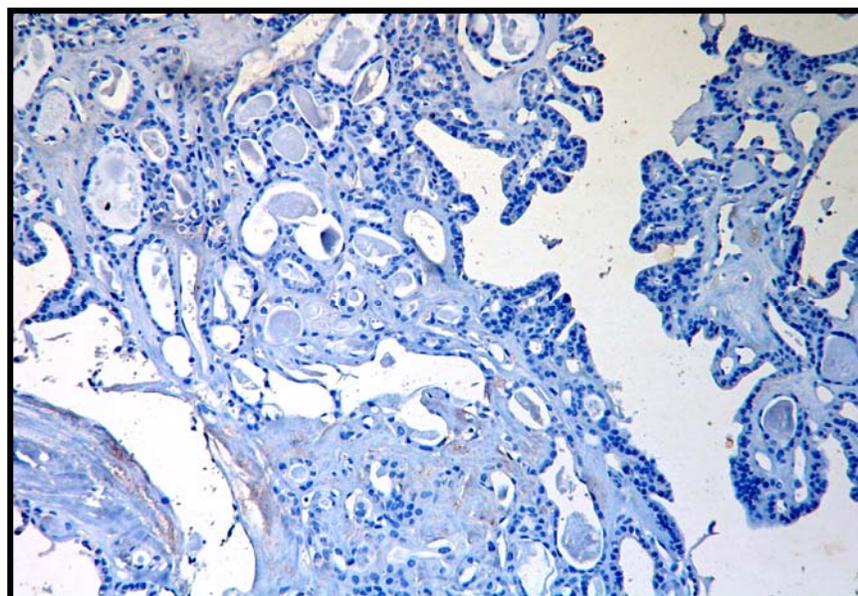


Figura 19- Carcinoma papilífero clássico da tireóide: ausência da expressão da proteína NIS pela técnica de imunohistoquímica (aumento original X 200)

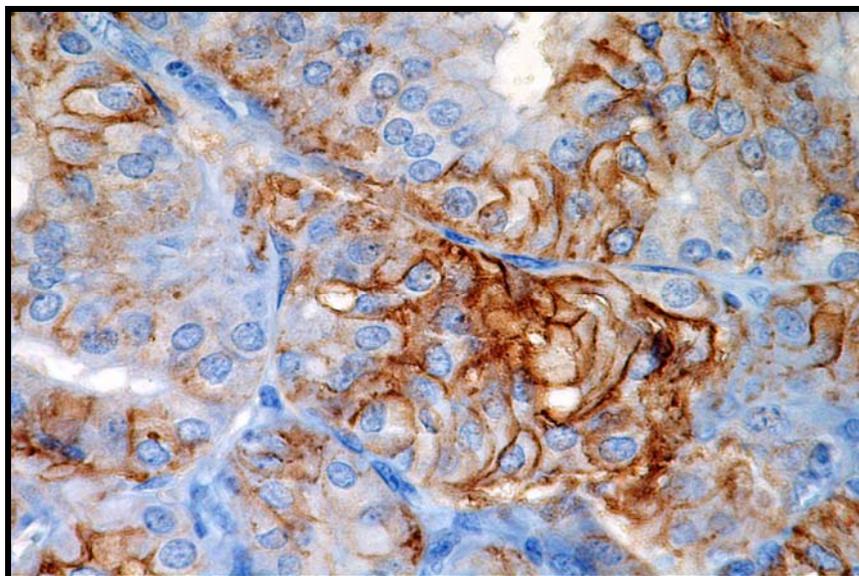


Figura 20- Carcinoma papilífero clássico da tireóide: expressão intensa e difusa da proteína NIS em membrana e citoplasma (marrom) pela técnica de imunohistoquímica (aumento original X400)

Entre os sete pacientes com CPVA seis foram positivos para MUC1, 6 foram positivos para p53 e 6 foram negativos para NIS, sugerindo que esses marcadores estejam relacionados com a agressividade desse tipo histológico, embora não tenha sido encontrada significância estatística entre eles.

Observou-se que não houve associação entre o prognóstico dos pacientes e nenhum dos marcadores de imunohistoquímica estudados.

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para p53, MUC e NIS, respectivamente representadas nas Figuras 21, 22 e 23, no entanto, sugerem que um acompanhamento mais longo e com maior número de pacientes possa mostrar diferença entre os grupos de boa e má evolução.

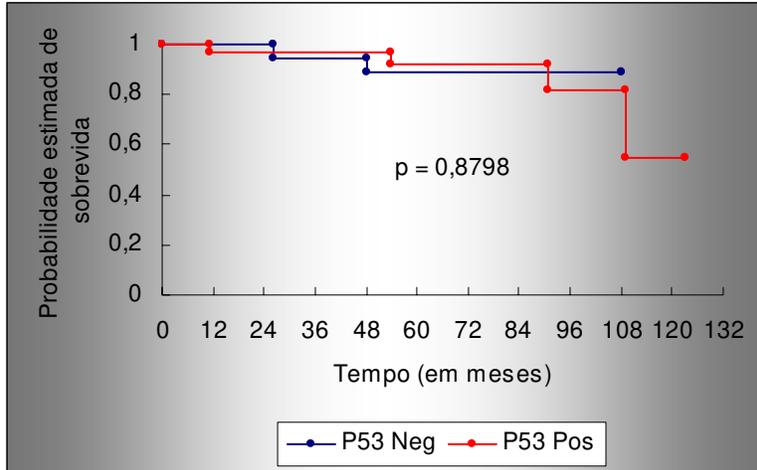


Figura 21- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para pacientes com expressão de p53 positiva e negativa

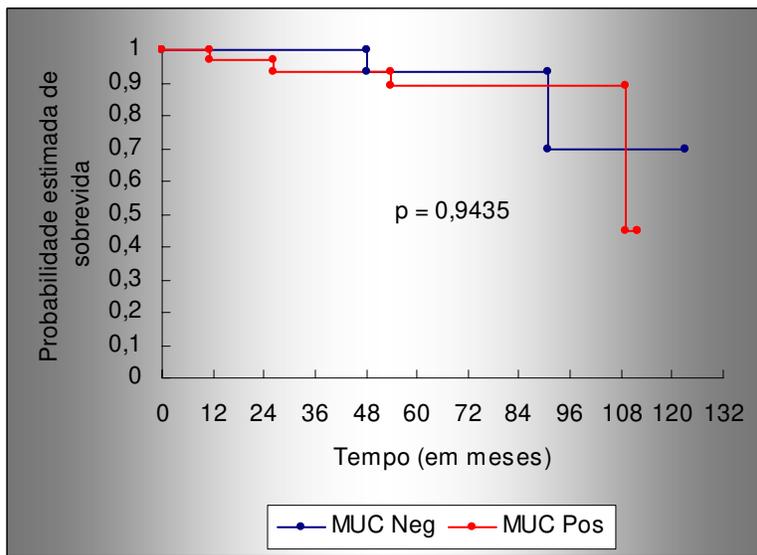


Figura 22- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para pacientes com expressão de MUC1 positiva e negativa

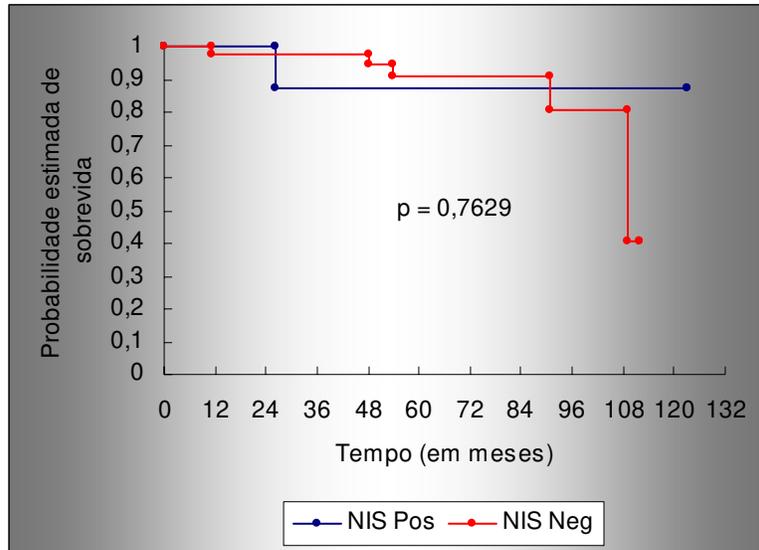


Figura 23- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para pacientes com expressão de NIS positiva e negativa

5- DISCUSSÃO

Nenhum grupo de fatores clínicos, cirúrgicos ou anatômicos é capaz de detectar com exatidão, em um determinado indivíduo, se este terá pior evolução, de forma que as classificações de prognóstico têm sido pouco usadas na prática clínica. Tem-se buscado intensamente marcadores moleculares que possam, ao lado dos clássicos parâmetros clínicos e anatomopatológicos, distinguir pacientes com tumores que poderiam evoluir de forma desfavorável daqueles com melhor prognóstico, e assim determinar um tratamento mais apropriado para cada indivíduo, minimizando os riscos cirúrgicos e o custo efetivo de cada tratamento (Ward e Assumpção, 2004). Pacientes de alto risco poderiam ser alvo de uma abordagem cirúrgica mais agressiva e de um seguimento mais próximo, em oposição à grande maioria de casos de bom prognóstico, ou baixo risco, que poderiam ser poupados de tais medidas (Mazzaferri e Jhiang, 1994; Zidan et al., 2003; Ward et al., 2003b; Souza et al., 2003).

Assim, no presente trabalho o objetivo foi avaliar a utilidade prognóstica da expressão de dois genes que devem ser hiperexpressos em tumores, os genes MUC e p53, e de um gene que deve ter sua expressão diminuída, o gene NIS. A associação da expressão destes genes em tumores primários com outros parâmetros bem conhecidos de prognóstico poderia ajudar a traçar diferentes estratégias de tratamento para o CDT. Infelizmente, estes dados iniciais não mostraram maior utilidade para tais parâmetros imunoistoquímicos.

P53 é um gene classicamente relacionado à evolução mais agressiva dos tumores humanos (Ward e Fagin, 1998). Ele participa de etapas finais do processo de carcinogênese tireoidiana sendo mais freqüentemente mutado em tumores pobremente diferenciados e nos anaplásicos (Ward e Fagin, 1998; Nikiforov, 2004). Goretzki assegura que mutações de p53 foram encontradas em mais de 40% dos carcinomas de tireóide de tipo dediferenciado e indiferenciado, enquanto, em carcinomas bem diferenciados da tireóide foram encontradas em menos de 10% dos casos (Goretzki et al., 1999). Talvez por esta característica não existem muitos estudos de p53 por imunoistoquímica em câncer da tireóide, um tumor bem diferenciado na maior parte dos casos. Ruter et al. (1996) estudaram por imunoistoquímica 18 casos de carcinoma papilífero variante de células altas e 18 casos de carcinoma papilífero clássico. Mostrou-se uma significativa positividade na

variante de células altas (61%) em relação ao papilífero clássico (11%), sugerindo que o carcinoma papilífero variante de células altas esteja associado com estádios tumorais mais avançados ao diagnóstico (Ruter et al. 1996). Realmente, entre os casos de CPVA a positividade para p53 também foi elevada (86 %).

Mais recentemente, Omar et al. (2004) estudaram por imunohistoquímica 50 casos de adenoma folicular, 66 hiperplasias nodulares e 53 carcinomas papilíferos. P53 foi evidenciado expresso e distribuído igualmente entre os grupos de adenomas foliculares, hiperplasias nodulares e carcinomas papilíferos. Dos 66 casos de hiperplasias nodulares, 11 (16.7%) mostraram positividade de p53. Dos 50 casos de adenomas foliculares, 7 (14%) mostraram positividade de p53. Entre os 53 carcinomas papilíferos, foi detectado p53 positivo em 9 (17%), seis deles eram carcinomas papilíferos clássicos, um caso de dois tumores da variante de células altas foi positivo e nenhum tumor da variante folicular foi positivo. Os pacientes foram acompanhados por dez anos. A curva de sobrevida mostrou que p53 foi um significativo fator de prognóstico na sobrevida dos pacientes com carcinoma papilífero (Omar et al., 2004).

Nos nossos dados são similares, pois também encontramos expressão de p53 em alguns casos benignos (3 casos). A positividade foi maior entre os casos histologicamente mais agressivos: 6 dos 7 (86%) casos de carcinomas papilíferos variante de células altas, mostraram positividade em p53. No entanto, entre os 21 casos de carcinomas papilíferos clássicos 13 (61.9%) mostraram positividade para p53, uma incidência relativamente elevada. Dos 3 casos de carcinoma anaplásico, 2 (66.7%) foram positivos para p53. Nos 16 casos de carcinoma folicular, 6 (37.5%) foram positivos para p53. Mas provavelmente, em virtude do pequeno número de casos e do tempo de seguimento relativamente pequeno, não encontramos significância estatística nesses números, nem qualquer relação com a evolução dos pacientes.

Acredita-se que a glicoproteína transmembrana MUC1 deva modular a adesão celular e, portanto, ser importante no processo de invasão e de metastatização à distância (Bieche et al. 1997; Magro et al. 2003; Wreesmann et al. 2002). Mais recentemente, alguns estudos sugerem que a expressão do gene MUC1 no carcinoma papilífero de tireóide é fator de mau prognóstico (Bieche et al. 1997; Magro et al. 2003; Wreesmann et al. 2004).

A expressão de MUC1 tem sido relacionada com o desenvolvimento de uma variedade de tumores. Em carcinoma pancreático, os pacientes com positividade para MUC1 tiveram uma pior evolução comparada com pacientes com MUC1 negativo (Hinoda et al., 2003). Em pacientes com câncer de vesícula com estadiamento T1, a expressão de MUC1 foi significativamente menor do que em tumores avançados e a expressão de MUC1 foi relacionada com a progressão do tumor (Ghosh et al., 2005). No câncer da tireóide, encontramos apenas um estudo na literatura. Wreesmann et al., 2004 realizou imunistoquímica para MUC1 em 50 casos de carcinomas papilíferos clássicos e 50 carcinomas papilífero variante de células altas. MUC1 esteve presente em 97.5% dos variantes de células altas comparadas com 35% de carcinomas papilíferos clássicos (Wreesman et al., 2004).

Dos 21 casos de carcinoma papilífero clássico do presente trabalho, 16 (76,1%) tiveram 100% de positividade para MUC1. Entre os casos benignos, somente 2 (20%) tiveram positividade para MUC1. Entre os 7 carcinomas papilífero variante de células altas, 6 (86 %) tiveram positividade para MUC1. 7 dos 16 casos de carcinoma folicular (43.7%) foram positivos para MUC variando a porcentagem de células coradas. Dos 4 casos de carcinoma medular, 3 (75%) foram positivos para MUC1. Nos anaplásicos, 2 (66.7%) dos 3 casos foram positivos para MUC1. No entanto, não conseguimos estabelecer, no relativamente pequeno número de casos que examinamos, correlação estatística da expressão de MUC com a agressividade tumoral ou com a evolução dos pacientes.

NIS é um óbvio marcador de prognóstico já que, embora não exclusivo das células tireoidianas, o transportador de iodo caracteriza sua estrutura e é essencial para sua função. Além disso, a expressão e adequado funcionamento de NIS são vitais para o reconhecimento de células residuais após a tireoidectomia e radioterapia, permitindo a localização de tecido residual e seu tratamento com iodo radioativo. Em trabalho anterior de nosso grupo, em concordância com vários outros trabalhos da literatura, mostramos que a expressão de NIS estava quantitativamente diminuída em tumores diferenciados da tireóide (Ward et al., 2003a). Esta menor expressão, sem dúvida responsável pela menor captação dos nódulos tumorais e seu clássico aspecto “frio” à cintilografia, ao limitar a conduta diagnóstica e terapêutica define o prognóstico dos pacientes. Seguindo um grupo

de pacientes com carcinoma papilífero por, pelo menos, dois anos, mostramos que uma parte desses pacientes possuía estadiamento mais avançado e evoluía com recorrência precoce, nível de Tg elevados indicando recidiva e metástases à distância. Em contraste, outro grupo de doentes de estadio menos avançado evoluía livre de doença. A quantificação de NIS no tumor primário permitiu distinguir nitidamente estes dois grupos com valores de mRNA muito baixos ou quase indetectáveis no grupo de má evolução, em contraste com valores muito mais elevados no grupo de boa evolução, como representado na Figura 24.

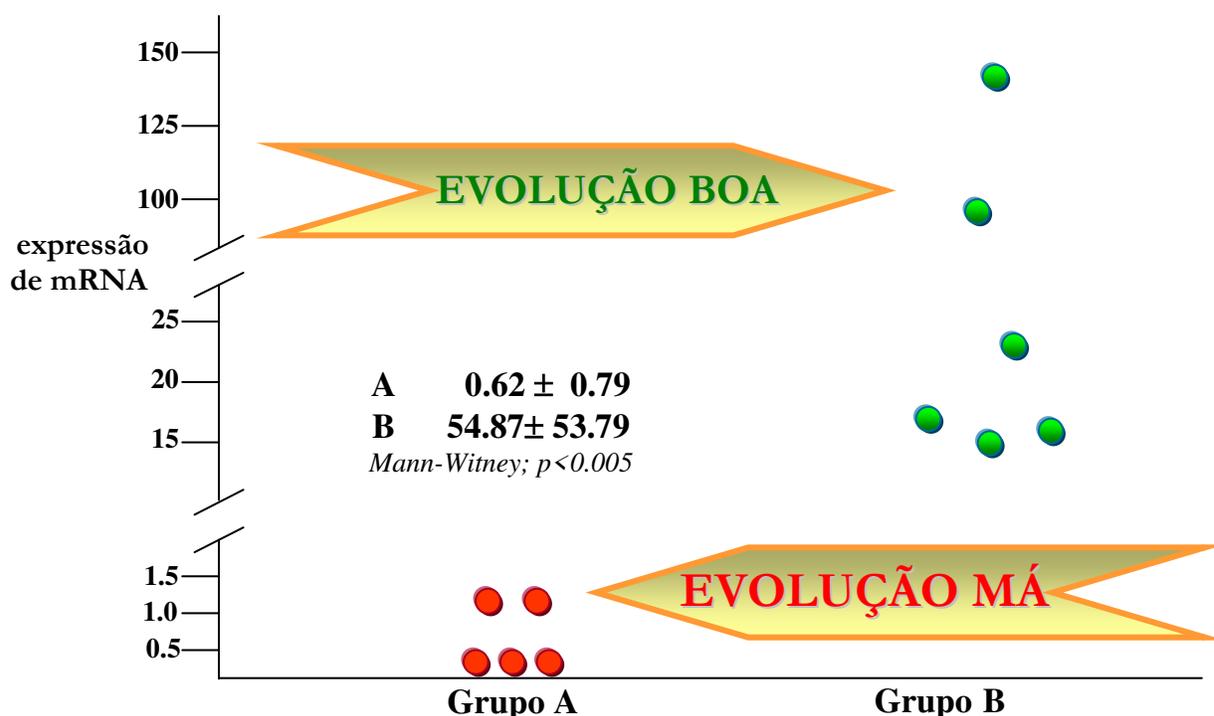


Figura 24- Comparação da quantificação da expressão de mRNA por PCR em tempo real em dois grupos: em verde boa evolução e em vermelho má evolução

Obviamente, a detecção de NIS em tumor poderia ser um excelente marcador de prognóstico. No entanto, seria necessário obter material pré-operatório para que a definição de agressividade pudesse anteceder a cirurgia, permitindo seu planejamento de forma mais adequada. Existem vários trabalhos que mostram a factibilidade de quantificar NIS por PCR em tempo real em material aspirado por agulha fina de tireóide

(Plantin-Carrenard et al., 2005), o que pode ser feito sem maiores dificuldades já que a punção aspirativa por agulha fina é exame diagnóstico rotineiro no nódulo da tireóide (Wang, 2006). No entanto, seria mais interessante, do ponto de vista prático, desenvolver metodologia mais fácil tecnicamente e de menor custo. A maior parte dos laboratórios de patologia utiliza a imunoistoquímica, método bem padronizado para o estudo de tumores humanos. Ora, o método pode ser adaptado ao estudo do aspirado por punção por agulha fina, o imunocitodiagnóstico. Um recente relato de Di Cristofaro et al. (2006) mostra que a detecção de TPO, outro marcador de diferenciação celular tireoidiana, é possível por imunocitoquímica. Mais ainda, Di Cristofaro et al. (2006) mostram que existe uma correlação muito boa entre a imunocitoquímica e a quantificação de TPO por PCR em tempo real, sugerindo que o desenvolvimento da imunocitoquímica para NIS possa se tornar uma importante arma de prognóstico. O primeiro passo para tanto, é o desenvolvimento de adequada técnica de imunoistoquímica.

Existem vários trabalhos contraditórios na literatura em relação à imunoistoquímica para NIS. Saito et al. (1998) estudaram 12 casos de carcinomas papilíferos e encontraram um aumento na expressão de NIS sendo 8 com forte positividade e 4 com fraca positividade (Saito et al. 1998). Estes resultados foram confirmados por Wapnir et al. (2003), que analisou um grande número de tecidos por microarrays e encontrou a expressão da proteína NIS em 75% das lesões benignas da tireóide e em 73% dos cânceres de tireóide (Wapnir et al. 2003). Dohán et al. (2001) estudando a proteína NIS por imunoistoquímica em um grande número de carcinomas diferenciados de tireóide encontraram superexpressão de NIS em 70% dos casos investigados comparados com tecidos normais (Dohán et al., 2001). Já Caillou et al. (2006) estudaram 9 carcinomas papilíferos e 5 carcinomas foliculares, encontrando pouca positividade para NIS em ambos (Caillou et al., 2006). Os achados da super expressão da proteína NIS em células com câncer de tireóide sugerem que o mecanismo para a diminuição da captação de iodo e, portanto, da atividade funcional da proteína, não é simplesmente relacionado à expressão do gene NIS. Além disso, Tonacchera et al. (2002) mostraram que a proteína NIS está localizada principalmente no citoplasma de nódulos de adenomas não funcionantes da tireóide, de modo que não conseguindo se localizar na membrana basolateral, a proteína não consegue desempenhar suas funções normais (Tonacchera et al., 2002).

Mais recentemente, o mesmo grupo de autores mostrou que, ao contrário dos adenomas não-funcionantes que apresentam elevados níveis de expressão da proteína NIS em relação ao tecido tireoidiano normal, nódulos hiperplásicos têm baixa expressão de NIS e ela está sempre confinada à membrana basolateral (Tonacchera et al., 2004). Portanto, a proteína poderia estar expressa mas sua localização anômala impediria sua função.

Nos nossos dados só encontramos positividade em membrana para NIS em dez dos 67 casos estudados. Entre os dez casos benignos encontramos NIS positivos em dois (20%), um era adenoma folicular e um era tecido normal corando a membrana. Dos 16 carcinomas foliculares estudados encontramos NIS positivo em 2 (12.5%) casos. Encontramos 1 (14.3%) caso positivo para NIS entre os 7 carcinomas papilífero variante de células altas e 1 (16,6%) caso positivo para NIS entre os 6 casos de carcinomas papilífero variante folicular. Apenas quatro casos (19%) foram positivos para NIS entre os 21 casos de carcinoma papilífero clássico estudados. Embora esta pequena amostragem pequena ainda não permita uma adequada interpretação destes resultados, eles, sem dúvida, não são animadores para o uso de NIS como marcador imunoistoquímico de prognóstico. Evidentemente, a observação da localização de proteína poderá ser interessante com maior número de casos.

6- CONCLUSÃO

Os dados mostraram que não houve correlação entre os achados imunoistoquímicos e a sobrevida ou prognóstico dos pacientes com CDT. A proteína p53 foi detectada em 24/34 (70,6 %) CP; 6/16 (37,5 %) CF; mas também em 3/10 (30 %) dos casos benignos. A proteína NIS foi detectada em 6/34 (17,6 %) CP; 2/16 (12,5 %) CF e em 2/10 (20 %) dos casos benignos. A proteína MUC1 foi detectada em 25/34 (73,5 %) CP; 7/16 (43,7 %) CF e em 2/10 (20%) dos casos benignos. A avaliação da expressão de NIS, p53 e MUC1 em carcinomas diferenciados da tireóide não mostrou maior utilidade nos casos estudados.

Uma parte dos portadores de CDT possui estadiamento mais avançado e evolução mais tormentosa. Confirmou-se o valor prognóstico do estadio, do tamanho tumoral e da presença de metástases à distância. No entanto, nossos dados sugerem que uma observação mais longa da evolução dos pacientes assim como uma análise de maior número de pacientes poderá demonstrar correlação entre a expressão destes marcadores de desdiferenciação celular e a evolução dos pacientes.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal B, Gendler SJ, Longenecker M. The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 1998; 4: 397-403.

Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M, Watson PF, Ludgate M, Weetman AP. Regulation and tissue distribution of the human sodium/iodide symporter gene. *Clinical Endocrinology* 1998; 49: 517-23.

American Cancer Society. Cancer facts and figure 2003. Disponível em: <http://www.cancer.org./docroot/PRO> (acesso em 11/2003).

Arnold A, Kim HG, Gaz RD, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *Journal of Clinical Investigation* 1989; 83(6): 2034-40.

Assumpção LVM, Souza SL, Ward LS. Avaliação de fatores de prognóstico no carcinoma diferenciado da tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metabologia* 2002; 46 [resumo]: S131.

Attardi LD. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. *Mutat Res* 2005; 569: 145-57.

Behrens J. Cell contacts, differentiation, and invasiveness of epithelial cells. *Invasion Metastasis. Review* 1994-95; 14: 61-70.

Bieche I, Ruffet E, Zweibaum A, Vild F, Videreau R, Franc B. MUC1 mucin gene, transcripts, and protein in adenomas and papillary carcinoma of the thyroid. *Thyroid*, 1997; 5: 725-53.

Bishop JM. The Molecular Genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-11.

Boone RT, Fan CY, Hanna EY. Well-differentiated carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Clin North Am* 2003; 36: 73-90.

Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol. Review* 1996; 213: 123-61.

Bresalier RS, Niv Y, Byrd JC, Duh QY, Toribara NW, Rockwell RW, et al.. Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potencial in animal models of human colon cancer metastasis. *J Clin Invest* 1991; 87 (3): 1037-45.

Brierley JD, Panzarella T, Tsang RW, Gospodarowicz MK, O'Sullivan B. A comparison of different staging systems predictability of patient outcome. Thyroid carcinoma as an example. *Cancer* 1997; 79: 2414-23.

Cady B. Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition. *Surg Oncol Clin N Am* 1998; 7: 633-44.

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

Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, et al.. Na⁺/symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocr and Metabolism* 2006; 83 (11): 4102-06.

Carrasco N. The thyroid sodium-iodide symporter (NIS): Cloning and potential clinical applications. *Thyroid Today* 1999; 22 (4): 1-11.

Carrasco, N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 65-82.

Castro MR, Gharib H. Thyroid nodules and cancer. When to wait and watch when to refer. *Postgrad Med.* 2000; 107 (1): 113-6, 119-20, 123-4.

Chow SM, Law SC, Mendenhall WM, Au SK, Yau S, Yuen KT, Law CC, Lau WH. Follicular thyroid carcinoma: prognostic factors and the role of radioiodine. *Cancer* 2002; 95: 488-98.

Chow SM, Law SC, Au SK, Mang O, Yau S, Yuen KT, Lau WH. Changes in clinical presentation, management and outcome in 1348 patients with differentiated thyroid carcinoma: experience in a single institute in Hong Kong, 1960-2000. *Clin Oncol* 2003; 15: 329-36.

Daí G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996; 379: 458-460.

De Groot, LJ, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. *J Clin Endocr Metabolism* 1995; 80: 2946-53.

Dean DS, Hay ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control* 2000; 7: 229-39.

Delange, F. The disorders induced by iodine deficiency. *Thyroid* 1994; 4: 107-128.

Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, De Micco C. Expression of TPO mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, braf, ras and pax 8 genes. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13 (2): 485-95.

Dohán O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2697-2700.

Dohán O, De La Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, et al.. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 2003; 24: 48-77.

Drinkwater NR, Sugden B. Mecanismos da carcinogênese. In Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX. *Manual de Oncologia Clínica*. 5° ed São Paulo: Fundação Oncocentro; 1991. p. 7-21.

Dyomin VG, Palanisamy N, Lloyd KO, Dyomina K, Jhanwar SC, Houldsworth J, Chaganti RS. MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t (1;14) (q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets. *Blood*. 2000; 95 (8): 2666-71.

Fagin JA. Molecular pathogenesis of carcinoma of follicular epithelium. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *The thyroid* 2000; 8 th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 886-98.

Fidler IJ. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer: principles & practice of oncology 1997; 135-52.

Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a Key transport system in thyroid cancer cell metabolism. Eur J Endocrinol 1999, 141: 443-57.

Fujimara H, Tatsumi KI, Miki K, Harada T, Miyai K, Takai SI, Amino N. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na/I symporter. Nat Genet 1997; 16: 124-5.

Furlanetto TW, Peccin S, De O Schneider MA, Dos S, Zimmer A, Dos Reis PS, et al.. Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women. Rev Assoc Med Bras 2000; 46: 331-4.

Ghosh M, Kamma H, Kawamoto T, Koike N, Miwa M, Kapoor VK, et al.. MUC1 core protein as a marker of gallbladder malignancy. Eur J Surg Oncol 2005; 31 (8): 891-6.

Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. Cancer 1997; 79: 564-73.

Gilles F, Goy A, Remache Y, Shue P, Zelenetz AD. MUC1 dysregulation as the consequence of a t (1;14) (q21;q32) translocation in an extranodal lymphoma. Blood 2000; 95 (9): 2930-6.

Gimmi CD, Morrison BW, Mainprice BA, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, et al.. Breast cancer associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells. Nature Med 1996; 2: 1367-1370.

Goretzki PE, Dotzenrath C, Simon D, Roher HD. Studies of oncogenes and tumour suppressor genes in human thyroid carcinomas, and their clinical implications. Langenbecks Arch Surg 1999; 384 (1): 1-8.

Graf H. Carcinoma de tireóide pouco diferenciado: novas considerações terapêuticas. Arq Bras Endocrinologia Metab, 2005, 49 (5): 711-8.

Greenspan FS. A glândula tireóide. In: Greenspan FS e Gardner DG. Endocrinologia Básica e Clínica. 7. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p.181-241.

Hadjieva T. Scoring patients' risk in differentiated thyroid cancer. *Onkologie* 2001; 24: 561-8.

Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993; 114: 1050-7.

Hay ID, Grant CS, Bergstralh EJ, Thompson GB, Van Heerden JA, Goellner JR. Unilateral total lobectomy: is it sufficient surgical treatment for patients with AMES low-risk papillary thyroid carcinoma? *Surgery* 1998; 124: 958-64.

Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. Review. *Endocr Rev* 2003; 24(1): 102-32.

Hilkens J, Buijs F, Hilgers J, Hageman P, Calafat J, Sonnenberg A, Van der Valk M. Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer* 1984; 34 (2): 197-206.

Hinoda Y, Ikematsu Y, Horinouchi M, Sato S, Yamamoto K, Nakano T, et al.. Increased expression of MUC1 in advanced pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 2003; 38: 1162-1166.

Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, Niehans GA. Mucin gene expression in normal preneoplastic and neoplastic gastric epithelium. *Cancer Res* 1995; 55: 2681-90.

Hosal SA, Apel RL, Freeman JL, Azadian A, Rosen IB, LiVolsi VA, Asa SL. Immunohistochemical localization of p53 in human thyroid neoplasms: correlation with biologic behavior. *Endocr Pathol* 1997; 8 (1): 21-8.

Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, Mckee RF, Rosai J, et al.. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. U.S and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation on Study. *Cancer* 2000; 89 (1): 202-17.

Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* 1998; 83: 2638-48.

Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics CA Cancer J Clin 2003; 53: 5-26.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. American Cancer Society. Cancer statistics 2004. CA cancer J Clin 2004, 54: 8-29.

Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, McGaughy VR, et al.. An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology* 1998; 139: 4416-9.

Kitamura Y, Shimizu K, Nagahama M, Sugino K, Ozaki O, Mimura T, et al.. Immediate causes of death in thyroid carcinoma: clinicopathological analysis of 161 fatal cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4043-9.

Knobel M, Medeiros-Neto G. Disorders associated to chronic iodine deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48 (1): 53-61.

Komatsu M, Yee L, Carraway KL. Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumour killing by lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2229-36.

Knudson, AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Nat Acad SCI USA* 1993; 90: 10914-21.

Kosugi S, Sato Y, Matsuda A, Ohyama Y, Fujieda K, Inomata H, et al.. High prevalence of T354P sodium/iodide symporter gene mutation in Japanese patients with iodide transport defect who have heterogeneous clinical pictures. *J Clin Endocr Metab* 1998; 83: 4123-9.

La Quaglia MP, Black T, Holcomb GW 3rd, Sklar C, Azizkhan RG, Haase GM, Newman KD. Differentiated thyroid cancer: clinical characteristics, treatment, and outcome in patients under 21 years of age who present with distant metastases. A report from the Surgical Discipline Committee of the Children's Cancer Group. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 955-9.

Levy, O; De La Vieja, A; Carrasco, N. The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Recent Advances. *J. Bioenerg Biomembr* 1998; 30: 195-206.

Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J. Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res.* 1992; 52 (8): 2318-24.

LiVolsi VA. *Surgical pathology of the thyroid*. Philadelphia: WB Saunders. 1990, p 421.

Magro G, Shappacassi M, Perissinotto D, Corsaro A, Borghese C, Belfiore A, et al.. Differential expression of mucins 1-6 in papillary carcinoma: evidence for transformation – dependent post – translational modifications of MUC1 in situ. *J Pathol*, 2003, 200: 357-69.

Marine D, Feiss HO. The absorption of potassium iodide by perfused thyroid glands and some of the factors modifying it. *J Pharmacol* 1915; 7: 557-76.

Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97: 418-28.

Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1447-63.

Mazzaferri EL, Young RL. Papillary thyroid carcinoma: a 10 year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients. *Am J Med* 1981; 70: 511-8.

Mendoza-Rodriguez CA, Cerbon MA. Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death. *Rev Invest Clin* 2000; 53 (3): 266-73.

Mirallie E, Visset J, Sagan C, Hamy A, Le Bodic MF, Paineau J. Localization of cervical node metastasis of papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 1999; 23: 970-3.

Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. Muc1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1994; 106: 253-361.

Namba H, Matsuo K, Fagin JA. Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Invest* 1990; 86 (1): 120-5.

Nikiforov, YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol.* 2004; 15 (4): 319-27.

Omar E, Madhavan M, Othman NH. Immunohistochemical localization of RET and p53 mutant protein of thyroid lesions in a North-Eastern Malaysian population and its prognostic implications. *Pathology* 2004; 36 (2): 152-9.

O'Neill JP. DNA damage, DNA repair, cell proliferation, and DNA replication: how do gene mutations result? *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2000; 97: 11137-9.

Osborne M, Boyle P, Lipkin M. Cancer prevention. *Lancet* 1997; 349 (11): 27-30.

Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem* 1999; 274: 1367-70.

Pillai MR, Kesari AL, Chellan VG, Madhavan J, Nair P, Nair MK. Spontaneous programmed cell death in infiltrating duct carcinoma: association with p53, bcl-2, hormone receptors and tumor proliferation. *J Pathol Res Pract* 1998; 194: 549-57.

Plantin-Carrenard E, Foglietti MJ, Beaudoux JL. Sodium/iodide symporter: physiopathological aspects and therapeutic perspectives. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53 (3): 174-82.

Robbins J, Merino MJ, Boice JD Jr, Ron E, Ain KB, Alexander HR, et al.. Thyroid cancer: a lethal endocrine neoplasm. *Ann Intern Med* 1991; 115: 133-47.

Ronga G, Filesi M, Montesano T, Melacrinis FF, Di Nicola A, Ventroni G, et al.. Death from differentiated thyroid carcinoma: retrospective study of a 40-year investigation. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17: 507-14.

Ruegemer JJ, Hay ID, Bergstralh EJ, Ryan JJ, Offord KP, Gorman CA. Distant metastases in differentiated thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic variables. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 501-8.

Ruter A, Dreifus J, Jones M, Nishiyama R, Lennquist S. Overexpression of p53 in tall cell variants of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 1996; 120 (6): 1046-50.

Saito T, Endo T, Kowaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T. Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3331-6.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1998; 101 (7): 1296-1300.

Samaan NA, Maheshwari YK, Nader S, Hill CS Jr, Schultz PN, Haynie TP, et al.. Impact of therapy for differentiated carcinoma of the thyroid: an analysis of 706 cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983; 56: 1131-8.

Santos AM, Sousa H, Pinto D, Portela C, Pereira D, Catarino R, et al.. Linking Tp53 codon 72 and p21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *European Journal of Cancer* 2006; 42 (7): 958-63.

Sato N, Oyamatsu M, Koyama Y, Emura I, Tamiya Y, Hatakeyama K. Do the level of nodal disease according to the TNM classification and the number of involved cervical nodes reflect prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland? *J Surg Oncol* 1998; 69: 151-5.

Savkur RS; Burris TP. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *Journal of Peptide Research* 2004; 63: 207-12.

Schlumberger M, Tubiana M, De Vathaire F, Hill C, Gardet P, Travagli JP, et al.. Long-term results of treatment of 283 patients with lung and bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocri Metab* 1986; 63: 960-7.

Schlumberger MJ. Diagnostic follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma: historical perspective and current status. *J Endocrinol Inves* 1999; 22: 3-7.

Schmutzler C, Kohrle J. Implications of the molecular characterizations o the sodium-iodide symporter (NIS). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106: 501-10.

Shaha AR. Thyroid carcinoma: implications of prognostic factors. *Cancer* 1998; 83: 401-2.

Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head Neck* 1998; 20: 26-30.

Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. Review. *Cancer*. 1996; 77 (8): 1605-13.

Shoup M, Stojadinovic A, Nissan A, Ghossein RA, Freedman S, Brennan MF, et al.. Prognostic indicators of outcomes in patients with distant metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 191-7.

Simpson WJ, Panzarella T, Carruthers JS, Gospodarowicz MK, Sutcliffe SB. Papillary and follicular thyroid cancer: impact of treatment in 1578 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 14: 1063-75.

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 339-45.

Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 1997; 138: 3555-58.

Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology* 1994; 24: 205-10.

Souza SL, Montalli da Assumpção LV, Ward LS. Impact of previous thyroid autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2003; 13: 491-5.

Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris JC. The sodium/iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3327-35.

Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extra thyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1746-51.

Strum JM; Phelps, PC; Mcatee, MM. Resting human female breast tissue produces iodinated proteins. *J Ultrastruct Res* 1983; 84: 130-39.

Surveillance, Epidemiology And End Results, National Cancer Institute, 2005- <http://seer.cancer.gov>. (acesso em 06/2006).

Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to no palpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med* 1997; 126 (3): 226-31.

Tomimori E, Pedrinola F, Cavaliere H, Knobel M, Medeiros-Neto G. Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area. *Thyroid* 1995; 5: 273-6.

Tonacchera M, Viacava P, Agretti P, Marco G, Perri A, Di Cosmo C, et al.. Benign nonfunctioning thyroid adenomas are characterized by a defective targeting to cell membrane or a reduced expression of the sodium iodide symporter protein. *J Clin Endocr Metabolism* 2002; 87 (1): 252-7.

Tonacchera M, Viacava P, Fanelli G, Agretti P, De Marco G, De Servi M, et al.. The sodium sodium-iodide symporter protein is always present at a low expression and confined to the cell membrane in nonfunctioning nonadenomatous nodules of toxic nodular goiter. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61 (1): 40-5.

Tyler, P. China confronts retardation of millions who lack iodine. *New York Times* 4, 1996.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 594-604.

Zaretsky JZ, Weiss M, Tsarfaty I, Hareuveni M, Wreschner DH, Keydar I. Expression of genes coding for pS2, c-erbB2, estrogen receptor and the H23 breast tumor-associated antigen. A comparative analysis in breast cancer. *FEBS Lett.* 1990; 265: 46-50.

Zidan J, Karen D, Stein M, Rosenblatt E, Basher W, Kutem A. Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma: clinical features, prognostic factors, treatment, and survival. *Cancer* 2003; 97 (5): 1181-5.

Zotter S, Lossnitzer A, Hageman PC, Delemarre JF, Hilkens J, Hilgers J. Immunohistochemical localization of the epithelial marker MAM-6 in invasive malignancies and highly dysplastic adenomas of the large intestine. *Lab Invest.* 1987; 57 (2): 193-9.

Wang HH. Reporting thyroid fine-needle aspiration: literature review and a proposal. *Diagn Cytopathol* 2006; 34 (1): 67-76.

Wang H, Lillehoj HP, Kim KC. MUC1 tyrosine phosphorylation activates the extra cellular signal-regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 448-54.

Wapnir IL, Van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, et al.. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocr Metabolism* 2003; 88: 1880-88.

Ward LS. *Genética Molecular do câncer: implicações no câncer da tireóide humana.* *Rev Bras Clin Terap* 1997; 23 (6): 212-18.

Ward LS, Fagin JA. Molecular genetics of thyroid cancer: evidence that inactivation of tumor supressor genes occurs at late stages of tumor progression. In *The molecular and cellular basis of pediatric endocrinology.* Humana Press Inc, Totowa, NJ, chapter 12, 1998; 201-211.

Ward LS. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. *Rev Bras Clin Terap* 2000; 26 (3):103-107.

Ward LS, Santarosa PL, Granja F, Assumpção LVM, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Letters* 2003a; 200 (1): 85-91.

Ward LS, Souza SL, Assumpção LVM. The impact of nodal metastases on prognosis of well-differentiated thyroid cancer suggests the practice of prophylactic neck dissection. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 2003b; 129: 495-6.

Ward LS, Assumpção LVM. 5. B.33. Thyroid cancer: prognostic factors and treatment. *Braz Arch Endo Metab*, 2004, 48: 126-36.

Ward E, Jemal A, Cokkinides V, Singh GK, Cardinez C, Hafoor A, Thun M. Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. *CA Cancer J Clin* 2004; 54 (2): 78-93.

Welker MJ, Orlov D. Thyroid nodules. *Am. Fam. Physician* 2003; 67: 559-66.

Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol.* 1995; 129 (1): 255-65.

Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell.* 1996; 7 (4): 565-77.

Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 1999; 59 (16): 4083-9.

Wolff, J. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. *Physiol Rev* 1964; 44: 45-90.

Wreesman VB, Ghossein RA, Patel SG, Harris CP, Schnaser EA, Shaha AR, Tuttle RM, Shah JP, Rao PH, Singh B. Genome – wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am J Pathol*, 2002, 191: 1549-56.

Wreesman VB, Siezck EM, Socci N, Hezel M, Belbin T, Childs G, et al.. Genome – wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. *Cancer Research*, 2004, 64: 3780-9.

Yonezawa S, Sato E. Expression of mucin antigens in human cancers and its relationship with malignancy potential. *Pathol Int* 1997; 47: 813-30.