



ANGÉLICA GOMES DA ROCHA

ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA VIA *HGF/c-Met/STAT3* NO
CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIROIDE

CAMPINAS

2014

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ANGÉLICA GOMES DA ROCHA

ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA VIA HGF/c-Met/STAT3 NO
CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIROIDE

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Laura Sterian Ward
CO-ORIENTAÇÃO: Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
ANGÉLICA GOMES DA ROCHA, E ORIENTADA PELA
PROF. DRA. LAURA STERIAN WARD.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R582e Rocha, Angélica Gomes, 1989-
Estudo da expressão proteica da via HGF/c-Met/STAT3 no carcinoma diferenciado da tireoide / Angélica Gomes da Rocha. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Laura Sterian Ward.
Coorientador: Antônio Hugo José Fróes Marques Campos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Proteínas proto-oncogênicas c-met. 3. Fator de crescimento de hepatócito. 4. Fator de transcrição STAT3. I. Ward, Laura Sterian, 1956-. II. Campos, Antonio Hugo J.F.M.. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of protein expression of HGF/c-Met/STAT3 pathway in differentiated thyroid carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Thyroid neoplasms

Proto-oncogene proteins c-met

Hepatocyte growth factor

STAT3 transcription factor

Área de concentração: Ensino em Saúde

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Ivan Felizardo Contrera Toro

Elaine Cristina Morari

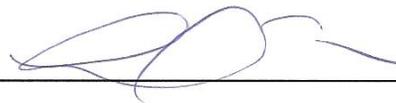
Data de defesa: 28-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

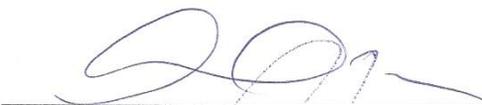
ANGÉLICA GOMES DA ROCHA

ORIENTADOR(A): PROF. DR. LAURA STERIAN WARD

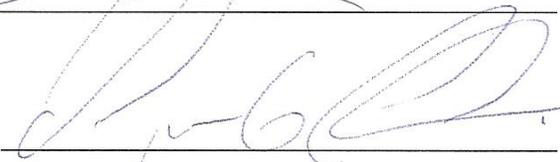


MEMBROS:

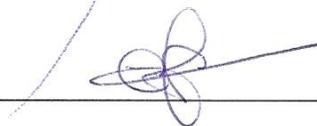
1. PROF. DR. LAURA STERIAN WARD



2. PROF. DR. IVAN FELIZARDO CONTRERA TORO



3. PROF. DR. ELAINE CRISTINA MORARI



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28 de agosto de 2014

Dedico esta dissertação aos meus pais
Alberto e Maria José e também aos meus
irmãos Alberto e Adriano, por todo o amor,
carinho e apoio em todos os momentos da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por estar sempre junto a mim, me amparar, auxiliar nas dificuldades e me proporcionar forças para sempre seguir em frente.

À minha orientadora Dra. Laura, pela oportunidade de estágio no Laboratório GEMOCA, por acreditar no meu potencial, por todas as oportunidades oferecidas, todos os aprendizados, correções e incentivos durante o decorrer do desenvolvimento deste projeto.

Ao meu coorientador Dr. Hugo, pela paciência e dedicação. Obrigada por todos os ensinamentos e por sempre arranjar tempo em sua agenda lotada para que pudéssemos analisar as imunos, agradeço também pelas ideias, pelas discussões dos resultados, e pelas conversas.

Aos meus pais, Alberto e Maria José, por todo amor, carinho, ensinamentos, por me apoiarem em todas as etapas da minha vida e fazerem de tudo para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. Sem vocês eu com certeza não chegaria tão longe. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Alberto e Adriano, por todas as conversas, risadas, brigas, mas acima de tudo, por todo o amor e cuidado que sempre tiveram comigo.

Aos meus padrinhos, Ana e Jair, que sempre estiveram próximos e me apoiaram em todas as minhas escolhas. Obrigada por cada conversa, cada conselho e todos os momentos divertidos que sempre tivemos juntos.

À melhor amiga que alguém pode ter, Nanda, por todas as conversas, risadas, e por ser sempre presente mesmo quando ausente. Obrigada por todo incentivo, e por ficar feliz comigo em cada uma das minhas conquistas.

Ao meu amigo, Rafael, pelas conversas, risadas, por sempre me mostrar que posso chegar cada vez mais longe, e por toda a diversão.

Aos técnicos do Laboratório de Investigação em Patologia, Paulo e Carol, pela ajuda com as lâminas e por me ensinarem a fazer imunoistoquímica. Obrigada pela paciência e pelos ensinamentos.

A todos do Laboratório GEMOCA, Fernando, Mariana, Marjory, Raquel, Jacqueline, Karina, Murilo, Ana Beatriz, Laís, Caroline, Natassia, Lucas, inclusive para aquelas que já saíram Renata, Aline, Ulieme e Elaine, pela convivência diária, por toda a motivação, pelos estudos, aprendizados, pelas nossas conversas, brincadeiras, e por terem se tornado mais do que apenas colegas de trabalho, por sermos uma família que briga, mas que ao mesmo tempo, vibra com as conquistas de cada um de nós.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

Marcadores de malignidade, especialmente capazes de distinguir lesões de padrão folicular, que sejam de fácil implantação na rotina do diagnóstico de nódulos tireoidianos, continuam sendo extremamente necessários, dado o crescente aumento de nódulos tireoidianos diagnosticados nos últimos anos. A via HGF/c-Met/STAT3 está relacionada com desenvolvimento e progressão tumoral, sendo que a expressão de c-Met, HGF e de STAT3 foram descritas em grande parte dos carcinomas papilíferos de tireoide (CPT), mas não em tecido tireoidiano normal, sugerindo sua relação com o desenvolvimento e progressão do CPT. Para avaliar a utilidade da expressão proteica de c-Met, HGF, STAT3, e de sua proteína fosforilada (pSTAT3) no diagnóstico e no prognóstico de pacientes com nódulos tireoidianos, analisamos 356 tecidos tireoidianos, sendo 153 carcinomas papilíferos (CPT), dos quais 95 eram clássicos (CPC), 47 carcinomas papilíferos variante folicular (CPVF), e 11 carcinomas papilíferos de células altas (CPCA); 34 carcinomas foliculares (CFT), 34 adenomas foliculares (AF), 124 bócios e 11 tecidos normais. Todos os pacientes foram tratados e acompanhados de acordo com um mesmo protocolo padrão por 1-10 anos (Mo=5 anos). Áreas representativas do tecido foram selecionadas para a construção de uma lâmina de *tissue microarray* (TMA) que foi submetida à técnica de imunoistoquímica e analisada pelo score de Allred. A expressão citoplasmática de c-Met foi capaz de diferenciar nódulos malignos de benignos ($p < 0,0001$, sensibilidade 86%, especificidade 76%, VPP 77%, VPN 86%); CPT de CF ($p = 0,0003$, sensibilidade 96%, especificidade 31%, VPP 87%, VPN 63%); variante folicular de CPT de CF ($p = 0,0232$ sensibilidade 93%, especificidade 31%, VPP 66%, VPN 77%); assim como variante folicular de CPT de AF ($p = 0,0003$, sensibilidade 93%, especificidade 50%, VPP 68%, VPN 87%). Além disso, a expressão de c-Met se correlacionou com tireoidite ($p < 0,0001$) e multifocalidade ($p = 0,0028$), mas não com presença de cápsula, invasão, tamanho do tumor, estadiamento TNM, e presença de metástase no diagnóstico e na evolução. A expressão nuclear de STAT3 diferenciou os nódulos benignos dos malignos ($p < 0,0001$, sensibilidade 83%, especificidade 74%, VPP 75%, VPN 83%); CF de AF ($p = 0,0457$, sensibilidade 80%, especificidade 52%, VPP 65%, VPN 71%); bócios de CPT variante folicular ($p < 0,001$, sensibilidade 89%, especificidade 65%, VPP 91%, VPN 60%); bócio de CF ($p < 0,0001$, sensibilidade 89%, especificidade 80%, VPP 95%, VPN 60%); bócio de AF ($p = 0,0005$, sensibilidade 89%, especificidade 80%, VPP 95%, VPN 60%). Além disso, a expressão de STAT3 se correlacionou com tireoidite ($p = 0,0095$) e multifocalidade ($p < 0,0001$), mas não com presença de

cápsula, invasão, tamanho do tumor, estadiamento TNM, e presença de metástase no diagnóstico e na evolução. A expressão de pSTAT3 e HGF não auxiliou no diagnóstico dos nódulos, e tampouco se correlacionou com características de agressividade dos tumores. Conclui-se que as proteínas c-Met e STAT3 podem ser consideradas marcadores clínicos úteis na rotina de laboratórios, uma vez que foram capazes de diferenciar os nódulos malignos dos benignos, alguns tipos histológicos dos nódulos, além de se correlacionarem com fatores de agressividade dos tumores.

Palavras-chave: câncer de tireoide, marcadores moleculares, c-Met, STAT3

Malignancy markers, especially the ones that are capable of distinguishing follicular lesions and with easy deployment in the routine diagnosis of thyroid nodules are much needed, given the increasing number of thyroid nodules in recent years. The HGF/c-Met/STAT3 pathway is related to the development and progression of many types of cancers, and c-Met, HGF and STAT3 expression were described in most papillary thyroid carcinomas (PTC), but not in normal thyroid tissue, suggesting it is related with the development and progression of PTC. To evaluate the usefulness of c-Met, HGF, STAT3, and its phosphorylated form (pSTAT3) protein expression in the diagnosis and prognosis of patients with thyroid nodules, we analyzed 356 thyroid tissues, including 153 papillary carcinomas (PTC), 95 classical type, 47 follicular variants of papillary carcinoma, and 11 tall cells carcinomas; 34 follicular carcinomas (FC), 34 follicular adenomas (FA), 124 goiters and 11 normal tissues. All patients were treated and monitored according to the same standard protocol for 1-10 years (Mo = 5 years). Representative tissue areas were selected for the construction of a tissue microarray (TMA) which was subjected to immunohistochemistry and analyzed by the Allred score. The cytoplasmic expression of c-Met was able to differentiate malignant from benign nodules ($p < 0.0001$, sensitivity 86%, specificity 76%, PPV 77%, 86% NPV); PTC from FCT ($p = 0.0003$, sensitivity 96%, specificity 31%, PPV 87%, 63% NPV); follicular variant of PTC from FCT ($p = 0.0232$ sensitivity 93%, specificity 31%, PPV 66%, NPV 77%); as well as follicular variant of CPT from FA ($p = 0.0003$, sensitivity 93%, specificity 50%, PPV 68%, 87% NPV). Furthermore, c-Met expression was correlated to the presence of thyroiditis ($p < 0.0001$) and multifocality ($p = 0.0028$), but not with the presence of capsule, invasion, tumour size, TNM staging, and metastasis at diagnosis or evolution of the disease. The nuclear expression of STAT3 differentiated benign from malignant nodules ($p < 0.0001$, sensitivity 83%, specificity 74%, PPV 75%, NPV 83%); FCT from FA ($p = 0.0457$, sensitivity 80%, specificity 52%, PPV 65%, NPV 71%); goiter follicular variant of PTC ($p < 0.001$, sensitivity 89%, specificity 65%, PPV 91%, 60% NPV); goiter from FCT ($p < 0.0001$, sensitivity 89%, specificity 80%, PPV 95%, NPV 60%); goiter from FA ($p = 0.0005$, sensitivity 89%, specificity 80%, PPV 95%, NPV 60%). In addition, STAT3 expression was associated with thyroiditis ($p = 0.0095$) and multifocality ($p < 0.0001$), but not with the presence of capsule, invasion, tumour size, TNM staging, and metastasis at diagnosis or evolution of the disease. The expression of pSTAT3 and HGF did not help the diagnostic of nodules and was not correlated with any tumour characteristic of aggressiveness. We concluded that c-

Met and STAT3 could be useful as molecular markers in laboratory routine, helping to differentiate malignant from benign nodules, and some histological types of nodules, and was also associated with some tumour characteristics of aggressiveness.

Keywords: thyroid cancer, molecular markers, c-Met, STAT3

LISTA DE ABREVIATURAS

95%IC	Coeficiente de Intervalo de Confiança de 95%
AF	Adenoma Folicular
ATA	Associação Americana de Tireoide
BRAF	do inglês: v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
CDT	Carcinoma Diferenciado da Tireoide
CFT	Carcinoma Folicular da Tireoide
CPC	Carcinoma Papilífero Clássico
CPCA	Carcinoma Papilífero de células altas
CPT	Carcinoma Papilífero da Tireoide
CPVF	Carcinoma Papilífero Variante Folicular
CT	Câncer de Tireoide
DAB	do inglês: diaminobenzidine tetrahydrochloride
EDTA	do inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid
FN1	Fibronectina-1
GALS3L	Galectina-3
GRB2	do inglês: growth factor receptor-bound protein 2
HC	Hospital de Clínicas
HGF	do inglês: hepatocyte growth factor
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KRT19	Keratina-19
MAPK	do inglês: mitogen-activated protein kinase

OR	Odds Ratio
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
pSTAT3	STAT3 fosforilada
SAS	Statistical Analysis System
SH2	do inglês: Src homology 2
STAT3	do inglês: Sinal transducer and activator of transcription 3
TMA	Tissue Microarray
TNM	do inglês: Tumor size, Nodes, Metastasis
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USA	do inglês: United States of America
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
Y705	Domínio tirosina 705 da STAT3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre características de sexo, idade e etnia dos grupos Benigno e Maligno.....	25
Tabela 2: Comparativo entre as médias de idade ao diagnóstico em nódulos benignos e nos malignos de tipo papilífero e folicular.....	25
Tabela 3: Comparação entre a expressão proteica de c-Met nos nódulos tireoidianos.....	27
Tabela 4: Comparação entre a expressão proteica de c-Met com relação à multifocalidade e presença de tireoidite.....	28
Tabela 5: Comparação entre a expressão proteica de STAT3 nos nódulos tireoidianos.....	30
Tabela 6: Comparação entre a expressão proteica de STAT3 com relação à multifocalidade e presença de tireoidite.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.....	03
Figura 2: Representação esquemática da via HGF/c-Met/STAT3 e sua relação com a via MAPK.....	07
Figura 3: Representação esquemática do Score de Allred.....	18
Figura 4: Expressão de c-Met nos nódulos tireoidianos.....	19
Figura 5: Expressão de STAT3 nos nódulos tireoidianos.....	20
Figura 6: Expressão de pSTAT3 nos nódulos tireoidianos.....	21
Figura 7: Expressão de HGF nos nódulos tireoidianos.....	22

1. Introdução	01
2. Objetivos.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. Casuística e Métodos	14
3.1. Casuística.....	15
3.2. Métodos	16
3.2.1. Construção da lâmina de Tissue Microarray	16
3.2.2. Imunoistoquímica.....	16
3.2.3. Análise Estatística.....	23
4. Resultados.....	24
4.1. Expressão c-Met	26
4.2. Expressão STAT3	28
4.3. Expressão pSTAT3.....	31
4.4 Expressão HGF.....	32
5. Discussão	33
6. Resumo dos achados	40

7. Conclusão.....	42
8. Referências Bibliográficas	44

1. INTRODUÇÃO

Nódulos na glândula tireoide são extremamente comuns, ocorrendo em cerca de 50% da população com mais de 50 anos de idade (1). Estes nódulos são detectados através de um exame físico, ou, mais frequentemente, por exames de imagem da região do pescoço (2). Embora sejam comuns, a grande maioria dos nódulos detectáveis é de nódulos benignos, e apenas 5% destes nódulos é câncer, sendo que os homens e pacientes com idade mais avançada são os que apresentam maior risco (3, 4).

Por outro lado, estimativas da Sociedade Americana de Câncer para o ano de 2013 mostraram que o câncer de tireoide (CT) foi o 5º tipo mais frequente de câncer entre as mulheres (5). Estes dados também foram válidos para o Brasil no mesmo período, no qual o câncer de tireoide ocupou o 4º tipo de câncer mais frequente na população feminina (6).

Para o ano de 2014, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que teremos cerca de 580 mil casos novos de câncer. Para este ano espera-se 1150 casos novos deste câncer para o sexo masculino, sendo o décimo terceiro mais frequente nos homens na região Sul e Nordeste, e nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, o décimo quarto. Para o sexo feminino estima-se 8050 novos casos, sendo o quinto colocado na classificação nacional, na Região Sul o quarto, na região Sudeste o sexto, e na região Centro-Oeste ocupará o nono lugar (7).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. Modificado de INCA, 2014 (7).

O CT apresenta diferentes tipos histológicos. A maioria dos carcinomas é do tipo papilífero (CPT), seguida dos carcinomas foliculares (CFT). Estes dois tipos são derivados das células foliculares e são agrupados como carcinomas diferenciados da tireoide (CDT). Os demais tipos são considerados mais raros e agressivos, sendo que os Indiferenciados representam aproximadamente 1% dos carcinomas tireoidianos, enquanto que os medulares, que são derivados das células parafoliculares, produtoras de calcitonina, representam apenas 3% dos carcinomas tireoidianos (8).

Os CPT representam aproximadamente 85% das malignidades epiteliais da glândula tireoide, sendo caracterizado pela presença de papilas e também por diferenças no núcleo das células (membrana nuclear com irregularidades, basofilia, perda da polarização basal do núcleo), embora algumas variantes não apresentem essas áreas, são totalmente de padrão folicular, sendo classificadas como variante folicular. Além disso, os CPT apresentam a propensão de invadir espaços linfáticos, causando lesões no restante da glândula, e até mesmo levando à metástase nos linfonodos (9). As variantes foliculares do CPT apresentam irregularidades na forma dos folículos, que são mais largos, e hipereosinófilos na periferia (10). Já os CFT são menos comuns e acometem aproximadamente 5%

das malignidades tireoidianas nas mais diversas regiões do mundo, sendo mais agressivo do que o CPT (11). Os carcinomas foliculares diferem dos adenomas foliculares por conta da presença de invasão, já que ambas são proliferações epiteliais foliculares e encapsuladas, com citologia e arquitetura celular uniforme, que diferem totalmente do parênquima celular. (10).

Dos pacientes que apresentam CPT, entre 20 – 90% apresentam metástase linfonodal no momento do diagnóstico, não dependendo somente do estágio em que o tumor se encontra, mas também do tamanho do tumor, invasão extracapsular e multifocalidade. (12). Já em relação às metástases no momento do diagnóstico, apenas aproximadamente 2% dos CPT apresentam metástases em locais que não sejam próximos ao pescoço, o que é indicativo de uma evolução ruim (13).

Para verificar se um nódulo é maligno ou não, cada vez mais pessoas são submetidas ao exame citológico por meio da punção aspirativa por agulha fina (PAAF), procedimento que não deixa de ser invasivo e é oneroso para o sistema de saúde (2, 14-17).

A citologia obtida através da PAAF é um exame de boa acurácia diagnóstica, sendo recomendada por todos os consensos (2, 18), mas, infelizmente, apresenta limitações, já que 20 a 30% dos nódulos não podem ser classificados de maneira confiável em benigno ou maligno, sendo chamados de lesão folicular de significado indeterminado/atipia de significado indeterminado; neoplasia folicular/ suspeito de neoplasia; ou suspeito de malignidade pela classificação de Bethesda (2, 15).

Um dos mais graves problemas é o fato da PAAF não ser capaz de diferenciar as células dos adenomas foliculares (AF), dos carcinomas foliculares (CFT), e também dos carcinomas papilíferos variante folicular (CPVF) (9).

A classificação das lesões de padrão folicular é uma das áreas mais controversas da anatomia patológica, já que essas lesões são muito parecidas umas com as outras, e apenas pequenos detalhes distinguem umas das outras, gerando dúvidas de consenso entre os patologistas mais especializados da área (10).

Nestes nódulos em que a PAAF não nos dá um diagnóstico seguro, já que não consegue diferenciar as lesões malignas das benignas, a grande maioria dos pacientes é operada para retirada cirúrgica da glândula tireoide para confirmação do diagnóstico histopatológico (19), porém aproximadamente 75% dos casos operados são de nódulos benignos (20, 21), o que gera um gasto desnecessário para nosso sistema de saúde.

Nos pacientes em que a citologia obtida pela PAAF é considerada suspeita, muitos clínicos ficam em dúvida sobre qual a melhor conduta clínica eles devem tomar, se devem repetir a PAAF, ou fazer uma tireoidectomia diagnóstica, ou se devem apenas acompanhar o paciente para ver sua evolução. (15).

Assim, novas armas diagnósticas que impeçam essas cirurgias desnecessárias são de extrema importância, e podem ser baseadas em marcadores moleculares para o câncer de tireoide (22).

O avanço nas pesquisas por esses marcadores moleculares vem possibilitando a introdução de novas ferramentas diagnósticas. Desde o ano de 2009, os guias da Associação Americana de Tireoide (ATA) recomendam fazer uma análise molecular nos casos em que a citologia é considerada indeterminada, mesmo sabendo que o considerado padrão ouro do diagnóstico das malignidades tireoidianas ainda é a histologia (23).

Diversas são as vias que vem sendo descritas como associadas com o desenvolvimento e progressão do CDT. Mutações nos genes controladores do ciclo celular, proliferação e apoptose são cruciais para a oncogênese tireoidiana.

Podemos destacar as mutações pontuais no gene *BRAF* e *Ras*, que são consideradas como eventos iniciais na tumorigênese tireoidiana (23). Sabemos que a maioria dos carcinomas papilíferos (CPT) apresentam mutações em genes codificadores de moléculas sinalizadoras da via MAPK (mitogen-activated protein kinase), além da hiperexpressão de genes como *GALS3L* (galectina-3), *FN1* (fibronectina-1), *KRT19* (keratina-19) e *MET* (gene da proteína c-Met) estarem relacionadas com o carcinoma papilífero (24, 25).

A via HGF/c-Met/STAT3 é muito estudada por estar relacionada com o desenvolvimento e progressão tumoral de diversos tipos de câncer, inclusive o de tireoide. Esta via é uma das responsáveis pelo controle da proliferação celular, adesão, mobilidade, invasão e também da sobrevivência celular (26). O proto-oncogene *Met* está localizado no cromossomo 7, no *locus* 7q31, e controla diversas vias de sinalização durante a embriogênese e cicatrização de feridas pela sua ligação com o fator de crescimento do hepatócito (HGF) (27). c-Met é um receptor transmembrana tirosina quinase que é ativado no momento de sua ligação com um fator de crescimento, ou uma citocina, como por exemplo, o HGF. c-Met libera então sinais *downstream* para as vias de sinalização que estão implicadas na invasão e migração das células cancerígenas. STAT3 (sinal transdutor e ativador de transcrição 3), por sua vez, está no citoplasma, é ativada, dimeriza e transloca até o núcleo, onde ativa e controla a transcrição de genes alvos específicos envolvidos no processo de carcinogênese (26). A figura 2 resume a via HGF/c-Met e mostra a sua relação com a via da MAPK.

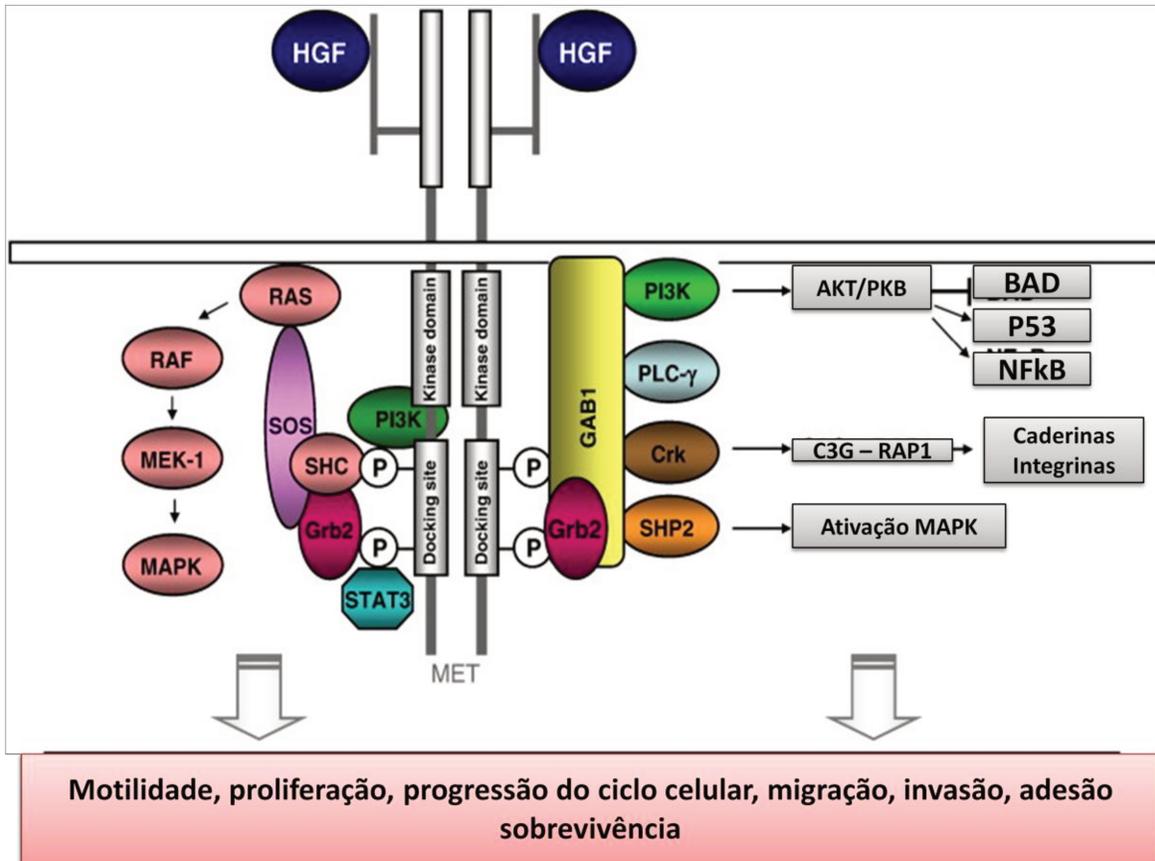


Figura 2. Representação esquemática da via HGF/c-Met/STAT3 e sua relação com a via da MAPK.

c-Met é uma glicoproteína transmembrana composta de uma unidade extracelular (subunidade α) e uma transmembrana (subunidade β) ligadas por pontes dissulfeto, no qual o domínio citoplasmático da subunidade β possui uma atividade tirosina quinase dependente de ligação para que seja ativada (28).

Tanto HGF quanto c-Met são produzidas no começo da embriogênese, e são expressas na endoderme e mesoderme, porém a expressão de HGF fica limitada as células mesenquimais, enquanto que c-Met é recrutada na ectoderme. A interação destas duas proteínas contribui para o desenvolvimento de vários órgãos, incluindo a glândula tireoide (29). Ambas são recrutadas a qualquer

momento pelo nosso organismo, independente do estágio de desenvolvimento, podendo até mesmo ser recrutadas para o desenvolvimento de células cancerígenas (30), o que pode ser comprovado no carcinoma hepatocelular, no qual a expressão de c-Met é aumentada no período de transformação das células normais do fígado para células cancerígenas (31).

Durante a reparação do tecido e invasão do câncer, c-Met desempenha um papel importante na diferenciação das células malignas. Esta proteína também está relacionada com invasão e migração destas células (32, 33). A ativação de c-Met faz com que as células se espalhem, uma vez que elas perdem sua ligação com células próximas, e também com a matriz na qual estavam ligadas, invadem tecidos próximos, e proliferam. Por esse motivo, esta proteína está relacionada com a progressão da doença, proliferação tumoral, e também pode ser uma das responsáveis pela formação de metástases (34, 35).

A expressão de c-Met é demonstrada em diversos tumores epiteliais, incluindo o CPT, e apresenta coloração em todo o tumor, frequentemente mais intensa na periferia do nódulo, onde as células cancerígenas infiltram o tecido (36). Essa proteína não está presente nos folículos tireoidianos normais, mas pode aparecer nos bócios, adenomas foliculares e tireoidite de Hashimoto, sugerindo que a expressão desta proteína seja regulada nas células tireoidianas normais e desregulada no CPT (37), indicando que a expressão de c-Met é frequente e é um dos primeiros eventos a acontecer na tumorigênese tireoidiana (38).

Entre as lesões tireoidianas, c-Met e HGF são expressas frequentemente nos CPT, e raramente expressas em CFT e carcinomas anaplásicos, podendo ou não se expressar em lesões benignas (39).

A ligação de c-Met com seu ligante específico, HGF, induz a ativação do domínio tirosina quinase de c-Met e a autofosforilação deste receptor (40). Essa autofosforilação gera sítios de ligação para diversas moléculas que contenham grupos SH2. Essas moléculas agem como transdutores intracelulares pela

ativação e recrutamento de diversos efetores, como por exemplo: GRB2, STAT3, entre outros (41).

O fator de crescimento do hepatócito (HGF) apresenta efeitos pleiotrópicos em diversos processos biológicos (30). Este fator de crescimento é sintetizado e secretado como pró-HGF, um precursor desta proteína que é convertida em uma molécula heterodimérica quando ativada (42). HGF é produzido por fibroblastos e por outras células do estroma, sendo encontrado no soro e acumulado na matriz extracelular e na base das membranas próximas as glicosaminoglicanas (43).

Concentrações elevadas de HGF circulante estão associadas com menor sobrevivência e desenvolvimento de metástase a distância, além de estarem correlacionadas com o tamanho do tumor, acometimento dos linfonodos e evidência de invasão venosa, sugerindo a participação deste fator de crescimento durante a migração do câncer e também desenvolvimento de metástase (44).

O efeito mitogênico de HGF é o mais expressivo dentre todos os fatores de crescimento, simplesmente pelo fato de HGF afetar diretamente a proliferação das células epiteliais. Nas células foliculares, e também nas células C da glândula tireoide, HGF é um potencial mitógeno, pois apresenta efeitos proliferativos e desdiferenciadores principalmente na fase de crescimento rápido do tumor (45).

As interações entre as células do tumor e o estroma apresentam um papel importante no crescimento e invasão, sendo que HGF é um fator crucial presente nessa interação. Por esse motivo, é interessante a inibição da ligação de HGF com c-Met para impedir a progressão tumoral (46).

Nos CPT, quando c-Met está ativada, HGF é produzida localmente pelos fibroblastos presentes no estroma tumoral, sendo um potente fator mitogênico e de sobrevivência. Embora HGF tenha diferentes funções e estas sejam dependentes de c-Met, a principal função de HGF é a ramificação da morfogênese, mas esta não estimula a migração celular ou invasão. Isto ocorre

apenas quando c-Met está pouco expressa, e temos um efeito menor da ramificação, porém este é suficiente para que ocorra a migração celular e invasão (47).

Os sinais transdutores e ativadores de transcrição (*STATs*) são uma família de sete membros que codificam proteínas citoplasmáticas, e estas estão envolvidas em uma série de processos celulares (48). Dentre as funções celulares que elas desempenham, temos: proliferação celular, crescimento, apoptose, sobrevivência, angiogênese e metástase (49, 50). Quando ativados, dímeros de *STATs* translocam até o núcleo, ligam-se a determinadas sequências no DNA, e modulam a expressão de genes alvos (50-52).

Dentro desta família, podemos destacar a proteína *STAT3*, que apresenta como principal função a transmissão de sinais do citoplasma para o núcleo (53). Além disso, ela está expressa nos mais diversos tipos de cânceres (54, 55). Nas células cancerígenas, a ativação de *STAT3* aumenta a expressão de determinados genes que, conseqüentemente, aumentam a proliferação celular, sobrevivência, angiogênese e o sistema imune de evasão, além de suprimir a produção de determinadas citocinas pro inflamatórias (54).

STAT3 está expressa ou ativada na maioria dos cânceres, mas isto não implica que seja decorrente de mutações no gene *STAT3*, já que as mutações somáticas nesse gene são extremamente raras (<1%) (56). A desregulação de diversas vias das quais *STAT3* participa faz com que a sinalização de *STAT3* não seja a encontrada nas células normais, levando à proliferação de células tumorais, a sobrevivência, a mobilidade, invasão e angiogênese. Além disso, a ativação do *STAT3* está associada à resistência a terapias específicas, e também, diminuição da sobrevida do paciente (57, 58).

Em relação ao processo de angiogênese do tumor, alguns autores relatam a necessidade da infiltração de células B no microambiente tumoral, para que a proteína *STAT3* participe ativamente da troca de informações entre as células do

tumor, as células endoteliais e também as células mieloides, promovendo assim este processo (59).

STAT3 é expressa em CPT, o que nos sugere que está proteína é ativada por fatores parácrinos (citocinas e fatores de crescimento), que são produzidos pelo estroma das células, e podem estar mediando a ativação de STAT3 nas células cancerígenas (60). Além disso, estudos feitos em modelos pré-clínicos demonstram que STAT3 é um supressor do crescimento tumoral, embora ainda precise se determinar em quais tipos histológicos isso acontece, e em qual estágio do desenvolvimento do câncer (61).

Sua expressão proteica é descrita em diversos estudos com câncer, e está presente em nódulos malignos e relacionada com a presença de metástases, especialmente nos linfonodos (62). No câncer de tireoide, estudos demonstram que STAT3 pode ser utilizado como um possível marcador de malignidade, já que em amostras de tecidos normais da tireoide, a coloração foi nula ou fraca, porém em CPT, aproximadamente 98% dos casos apresentaram a expressão da proteína STAT3. No CDT a expressão desta proteína não está relacionada com a presença de metástase (62, 63).

A fosforilação de STAT3 no domínio tirosina 705 (Y705) (pSTAT3) é crítica para a ativação de STAT3. Várias são as proteínas tirosina quinase que fosforilam diretamente STAT3 no Y705, como os receptores de citocinas e quimoquinas, e seus co-ativadores (64).

A proteína STAT3 fosforilada (pSTAT3), que é considerada ativa, tem sua expressão relacionada com sobrevivência, desenvolvimento de tumores menores (65) e menos agressivos em diversos tipos de tumores sólidos como mama, cabeça e pescoço, e pulmão (66). No CT, esta expressão é encontrada nos adenomas, e também nos CPT, e pode ainda estar relacionada com a presença de metástase óssea e pulmonar (61).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a expressão das proteínas c-Met, HGF, STAT3 e pSTAT3 em tumores de tireoide.

2.1.1. Objetivos Específicos

a. Verificar se a expressão das proteínas c-Met, HGF, STAT3 e pSTAT3 é diferente em nódulos malignos e benignos.

- Se for diferente, determinar se esta expressão pode auxiliar na detecção e caracterização dos diferentes tipos histológicos de nódulos tireoidianos

b. Verificar se a expressão das proteínas c-Met, HGF, STAT3 e pSTAT3 têm relação com a evolução dos pacientes.

c. Verificar se a estas proteínas podem ser indicadoras de características de agressividade dos pacientes com câncer diferenciado de tireoide,

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Este estudo é do tipo retrospectivo, e foram utilizados 356 tecidos tireoidianos, sendo 153 carcinomas papilíferos (CPT), dos quais 95 eram clássicos (CPC), 47 carcinomas papilíferos variante folicular (CPVF), e 11 carcinomas papilíferos de células altas (CPCA); 34 carcinomas foliculares (CFT), 34 adenomas foliculares (AF), 124 bóciós e 11 tecidos normais. Os tecidos malignos foram provenientes tanto do Hospital de Clínicas (HC) da UNICAMP (40 casos) quanto do A.C.Camargo Cancer Center (147 casos). Já os tecidos dos nódulos que não eram malignos (bóciós, adenomas e tecidos tireoidianos normais) foram provenientes apenas do A.C.Camargo Cancer Center (169 casos).

Todos os pacientes participantes deste estudo apresentaram nódulos tireoidianos, e seguiram um protocolo padrão da instituição, que inclui tireoidectomia e exploração cervical para detectar a existência de linfonodos acometidos pela doença. Através dessa análise, 68 pacientes apresentaram linfonodos acometidos no momento da cirurgia.

Nos prontuários de cada um dos pacientes foram coletados dados de identificação como idade de diagnóstico, sexo (278 mulheres e 51 homens), etnia (152 brancos e 24 não brancos), dados clínicos, pré-cirúrgicos, dieta, tabagismo (35 fumantes), uso de medicamentos e drogas, exames realizados como ultrassom, pesquisa de corpo inteiro com iodo¹³¹, biópsia aspirativa, dados referentes à cirurgia e do exame anatomopatológico, tais como medida do tumor (85 com nódulos < 2 cm, 77 com nódulos entre 2 e 4 cm, 54 com nódulos >4 cm), tipo histológico como descrito acima, multifocalidade (122 pacientes apresentaram mais de um nódulo), se o nódulo era ou não capsulado (43 nódulos capsulados), invasão (presente em 91 casos), tireoidite (presente em 72 nódulos), e metástase na evolução da doença (44 pacientes apresentaram metástase). A média de idade dos pacientes foi de $46,3 \pm 15,05$ anos, e a média do tempo de seguimento foi de aproximadamente 5 anos e meio ($66,07 \pm 56,9$ meses).

3.2. Métodos

3.2.1. Construção da lâmina de Tissue Microarray

Os tecidos de cada um dos pacientes foram fixados em formalina assim que as peças cirúrgicas foram retiradas, e incluídos em parafina, para que lâminas de seção fossem cortadas e o diagnóstico confirmado. A fim de construir uma lâmina de Tissue Microarray (TMA), um patologista analisou cada uma das lâminas de seção, e selecionou a área mais representativa de cada um dos tecidos. Uma vez selecionada a lâmina, e a sua área, os respectivos blocos tiveram esta área marcada. As lâminas de TMA foram construídas, sempre em duplicata ou triplicata (quando possível), por um técnico no Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, utilizando o equipamento Manual Tissue Arrayer (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA). Uma vez montadas, elas receberam um banho de parafina e foram colocadas em estufa à 110°C durante uma hora para fixação das seções nas lâminas. Passado esse tempo, foram armazenadas em freezer – 20°C até o momento do uso.

3.2.2. Imunoistoquímica (Reação da Immunoperoxidase)

As imunoistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Investigação em Patologia (LIP) da UNICAMP. Para analisar a expressão proteica de c-Met, HGF, STAT3 e pSTAT3 os cortes foram desparafinados em banho de xilol à 110°C. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico em concentrações decrescentes. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com água oxigenada (10 volumes), seguidas de lavagem em PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 a 7,6). Para a recuperação antigênica utilizamos panela a vapor T-fallR (Franca), com o objetivo de desmascarar antígenos. A recuperação antigênica foi feita com tampão específico para cada um dos anticorpos utilizados, sendo citrato ou EDTA conforme as especificações do

fabricante. Após esta etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico para cada uma das proteínas a 4°C, durante a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com DAKO ADVANCE™ HRP - polímero de alta sensibilidade. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, SIGMA, St. Louis – USA, código D5637). As lâminas foram, então, contra coradas com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, banhos de xilol e a seguir, as lâminas foram montadas com lamínulas e resina Entellan (Merck 1079610100). Para atestar a positividade da reação imunoistoquímica, utilizamos controles sabidamente positivos indicados na bula de cada um dos anticorpos. Para c-Met, utilizamos como controle positivo tecido de câncer de mama, e a diluição escolhida foi de 1/50. Para STAT3, o controle positivo foi tecido tumoral de cérebro, na diluição de 1/1600. Para pSTAT3, o controle positivo foi tecido de adenocarcinoma de cólon, na diluição de 1/250. Para HGF, o controle positivo foi tecido renal normal, na diluição de 1/100.

Para análise visual dos resultados de imunoistoquímica utilizamos o score de Allred, que considera a proporção e a intensidade. O score da proporção vai de 0 a 5, sendo 0 quando não há nenhuma célula corada, 1, 1/100 das células coradas, 2, 1/10 das células coradas, 3, 1/3 das células coradas, 4, 2/3 das células coradas e 5, todas as células coradas. A intensidade da coloração foi graduada em categorias: sem expressão (0) e positiva: fraca (1), moderada (2) e forte (3). Uma vez analisadas a proporção e a intensidade, somamos essas duas variáveis e temos um resultado que varia de 0 a 8, no qual: tecidos com score entre 0 e 2 foram considerados negativos, e de 3 a 8, considerados positivos, como ilustra a figura 3 (67, 68).

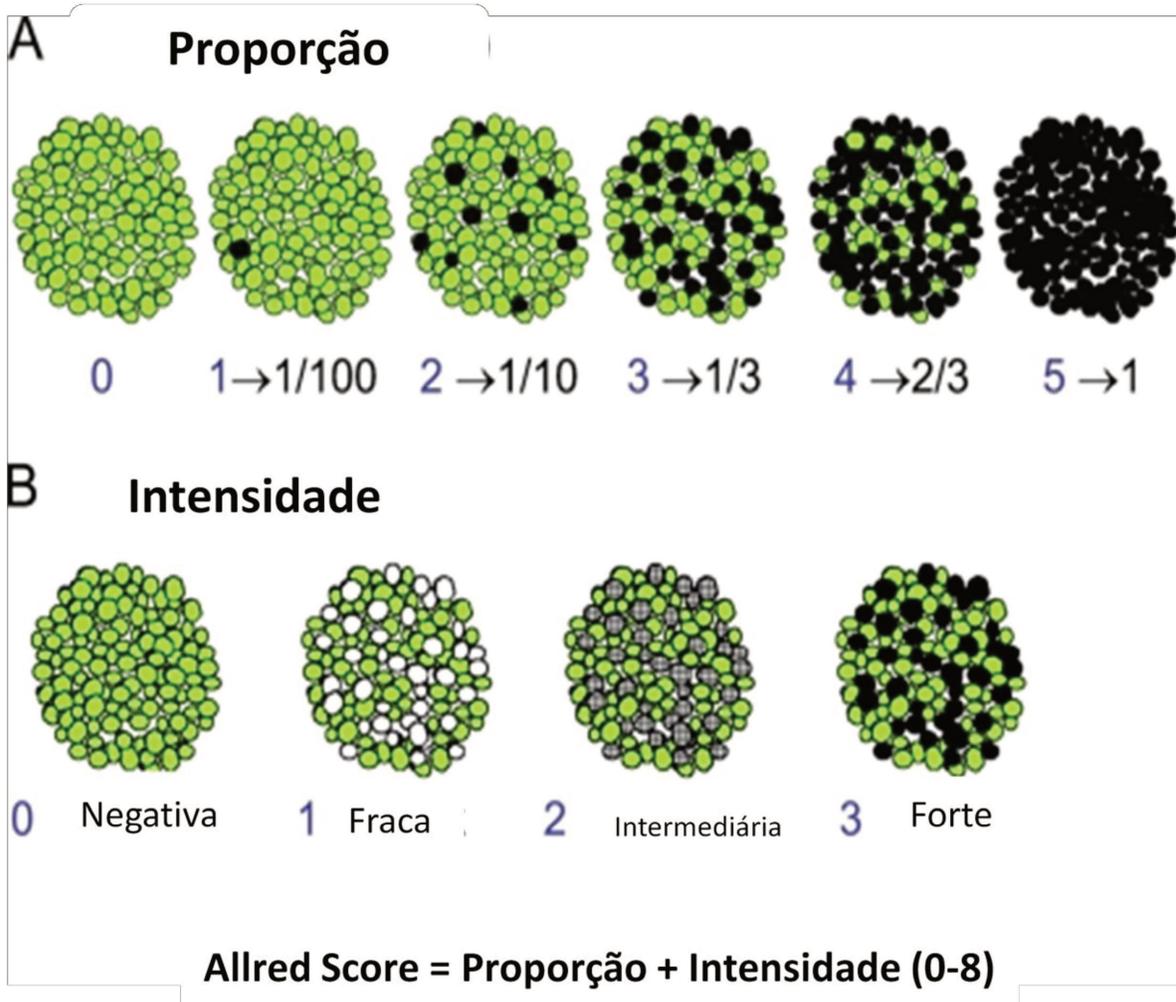


Figura 3: Representação esquemática do Score de Allred. Adaptado de Choudhury KR *et al.*, 2010 (68).

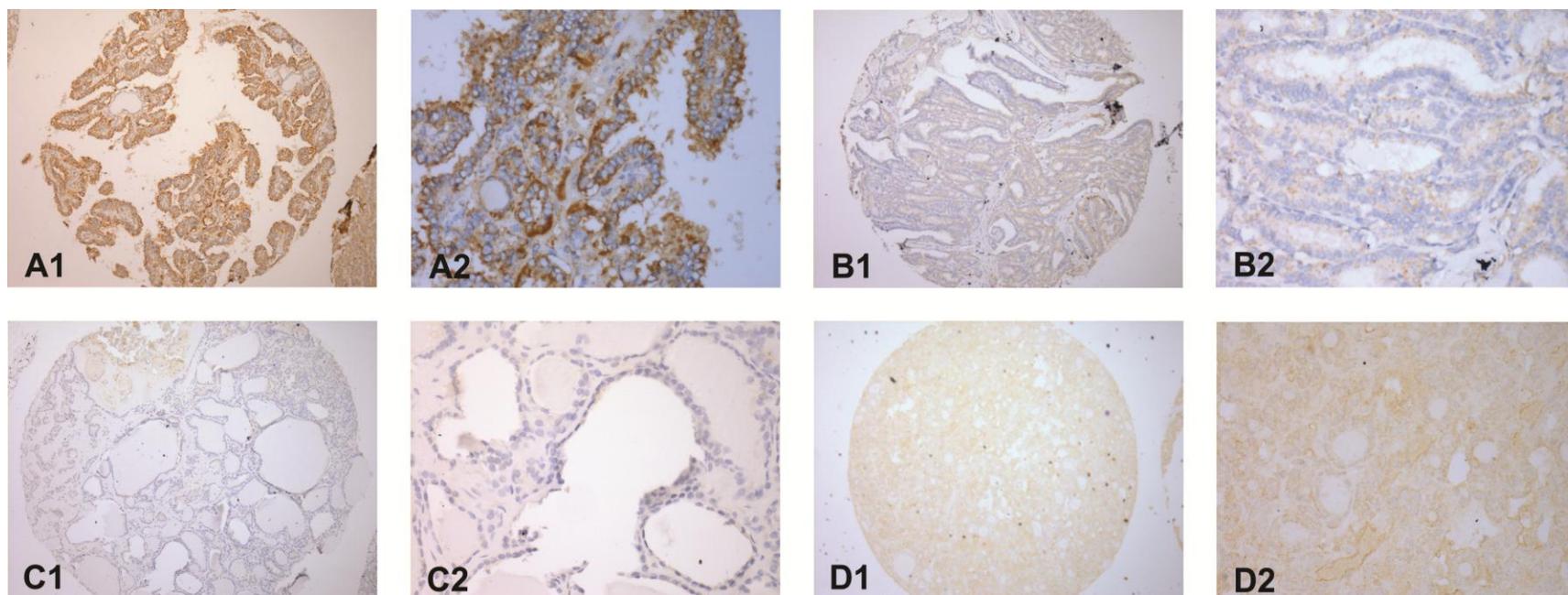


Figura 4: Expressão de c-Met nos nódulos tireoidianos. (A1) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 100x); (A2) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 400x); (B1) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 100x); (B2) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 400x); (C1) sem expressão em bócio colóide (aumento de 100x); (C2) sem expressão em bócio colóide (aumento de 400x), (D1) expressão em adenoma folicular (aumento de 100x); (D2) expressão em adenoma folicular (aumento de 400x).

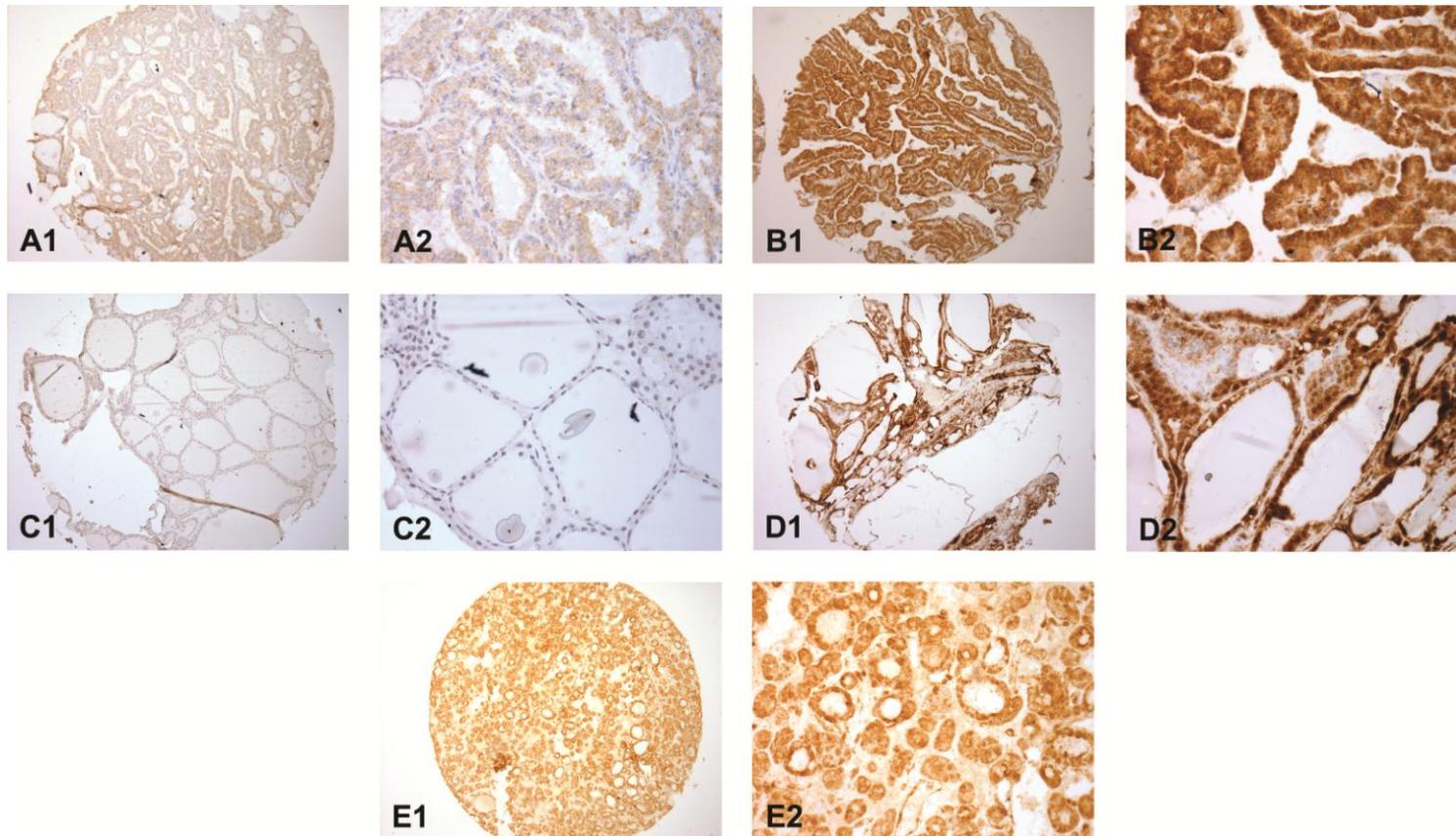


Figura 5: Expressão de STAT3 nos nódulos tireoidianos. (A1) expressão citoplasmática e sem expressão nuclear em carcinoma papilífero (aumento de 100x); (A2) expressão citoplasmática e sem expressão nuclear em carcinoma papilífero (aumento de 400x); (B1) expressão citoplasmática e nuclear em carcinoma papilífero (aumento de 100x); (B2) expressão citoplasmática e nuclear em carcinoma papilífero (aumento de 400x); (C1) sem expressão em bócio colóide (aumento de 100x); (C2) sem expressão em bócio colóide (aumento de 400x), (D1) expressão citoplasmática e nuclear em bócio colóide (aumento de 100x); (D2) expressão citoplasmática e nuclear em bócio colóide (aumento de 400x); (E1) expressão citoplasmática e nuclear em adenoma folicular (aumento de 100x); (E2) expressão citoplasmática e nuclear em adenoma folicular (aumento de 400x).

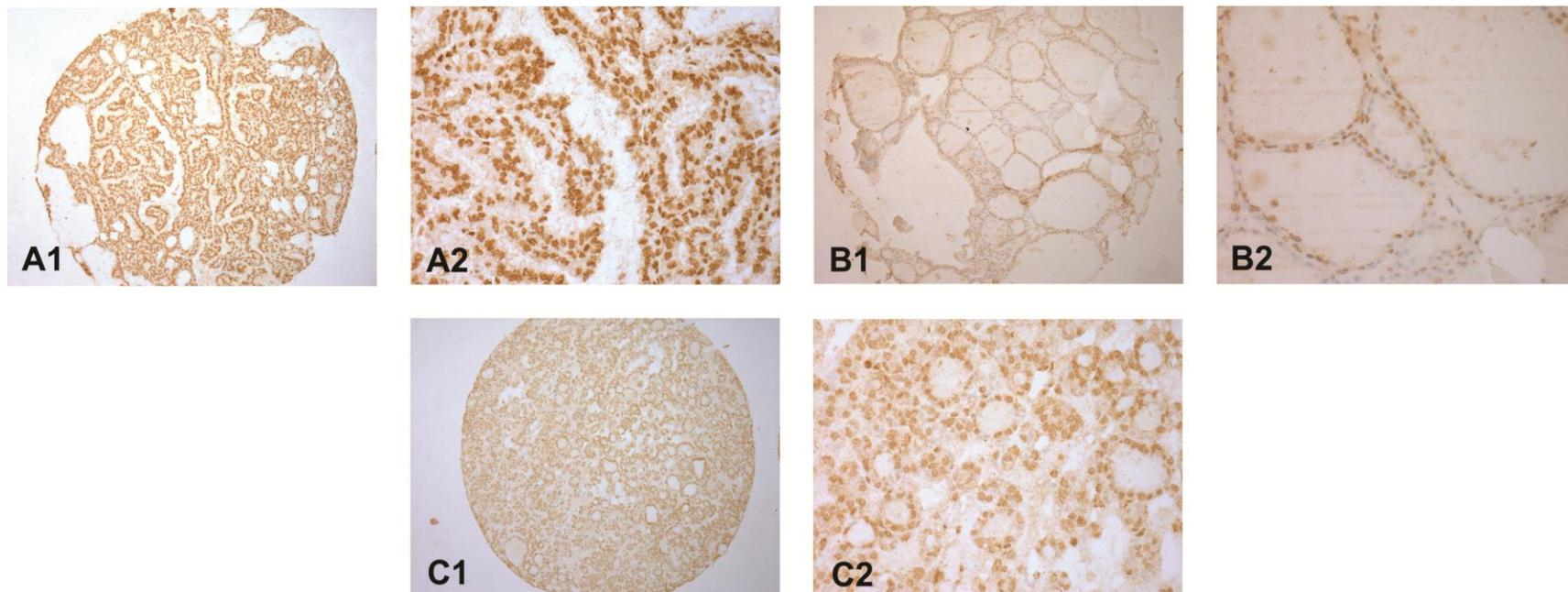


Figura 6: Expressão de pSTAT3 nos nódulos tireoidianos. (A1) expressão nuclear em carcinoma papilífero (aumento de 100x); (A2) expressão nuclear em carcinoma papilífero (aumento de 400x); (B1) expressão nuclear em bócio colóide (aumento de 100x); (B2) expressão nuclear em bócio colóide (aumento de 400x); (C1) expressão nuclear em adenoma folicular (aumento de 100x); (C2) expressão nuclear em bócio colóide (aumento de 400x).

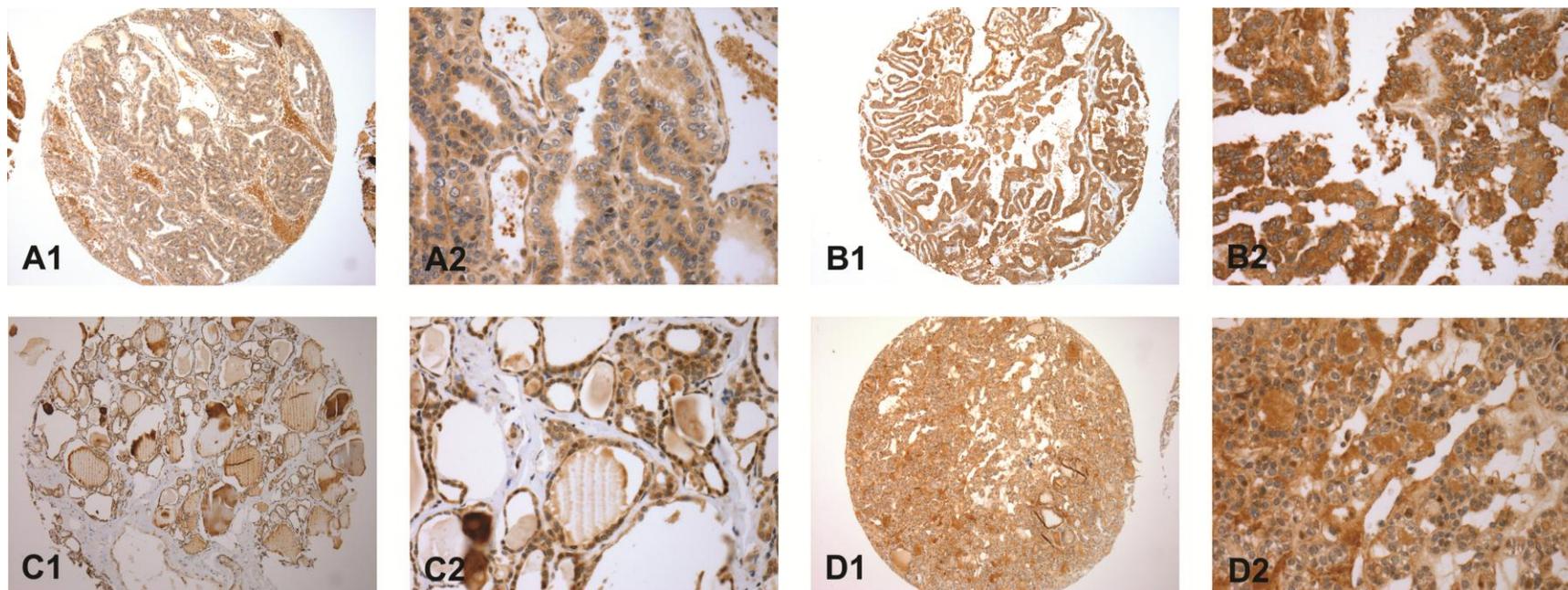


Figura 7: Expressão de HGF nos nódulos tireoidianos. (A1) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 100x); (A2) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 400x); (B1) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 100x); (B2) expressão em carcinoma papilífero (aumento de 400x); (C1) expressão em bócio colóide (aumento de 100x); (C2) expressão em bócio colóide (aumento de 400x), (D1) expressão em adenoma folicular (aumento de 100x); (D2) expressão em adenoma folicular (aumento de 400x).

3.2.3. Análise Estatística

Para análise estatística utilizou-se o programa computacional SAS System for Windows (Statistical Analysis System, versão 9.3, SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA). Foi realizada análise exploratória de dados através de medidas resumo (frequência) dos dados categóricos e estatísticas descritivas dos dados quantitativos. Para análise da relação entre a expressão das proteínas e os casos de câncer foi utilizada a análise de regressão logística univariada. Para a comparação entre os fatores de risco e os casos de câncer foram utilizados o teste Qui-quadrado para as variáveis categóricas e o teste de Kruskal-Wallis para as variáveis quantitativas. Para a comparação entre os dados dos tumores e a expressão das proteínas foi utilizado o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher.

O nível de significância adotado para este estudo foi de 5%.

4. RESULTADOS

Não houve diferença entre os grupos maligno e benigno em relação a sexo, etnia e tabagismo, como ilustra a tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre características de sexo, idade e etnia dos grupos Benigno e Maligno.

Anátomo Patológico	Sexo		Etnia		Tabagismo	
	Feminino (%)	Masculino (%)	Branco (%)	Não branco (%)	Não fuma (%)	Fuma (%)
Benigno	47,1	39,2	46,1	33,3	46,7	34,3
Maligno	52,9	60,8	59,9	66,7	53,3	65,7
Valor de p	0,2976		0,2437		0,1913	

Entretanto quando esta comparação foi feita em relação às médias de idade ao diagnóstico, encontramos que a média dos pacientes com câncer papilífero foi inferior aos pacientes com câncer folicular, e também nódulos benignos ($p < 0,0001$), como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Comparativo entre as médias de idade ao diagnóstico em nódulos benignos e nos malignos de tipo papilífero e folicular.

Anátomo Patológico	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p
Benignos	143	49,3	50	15,05	$p < 0,0001$
Foliculares	31	54,5	58	19,06	
Papilíferos	147	41,5	41	15,5	

4.1. Expressão c-Met

A expressão proteica de c-Met foi observada no citoplasma, e mostrou-se capaz de distinguir os nódulos malignos (86,7% dos casos positivos para a expressão) dos benignos (13,3%) com valor de $p < 0,0001$, sensibilidade 86%, especificidade 76%, Valor Preditivo Positivo (VPP) 77% e Valor Preditivo Negativo (VPN) 86%, como ilustra a tabela 3.

Uma regressão logística univariada ajustada para idade para a expressão de c-Met mostrou que os pacientes com expressão positiva para esta proteína apresentavam aproximadamente 17 vezes mais chances de desenvolver um nódulo maligno quando comparados com os que apresentam a expressão negativa ($p < 0,0001$; OR 16,6; 95%IC 8,9 – 30,9).

Ao comparar a expressão desta proteína nos nódulos malignos, para verificar se seria útil no diagnóstico de determinados tipos histológicos, c-Met diferenciou os carcinomas papilíferos da tireoide (CPT) dos carcinomas foliculares (CFT) com $p = 0,0003$, sensibilidade 96%, especificidade 31%, Valor Preditivo Positivo 87% e Valor Preditivo Negativo 63%.

c-Met foi capaz, ainda, de diferenciar os carcinomas papilíferos de variante folicular (CPVF) dos carcinomas foliculares (CFT) com $p = 0,0232$, sensibilidade 93%, especificidade 31%, valor preditivo positivo 66% e valor preditivo negativo 77%.

Considerando as lesões foliculares, c-Met pode auxiliar, uma vez que a sua marcação foi mais frequente entre os CPVF quando comparado com os CFT, e com os adenomas foliculares (AF), $p = 0,0004$.

Ainda em relação às lesões foliculares, a expressão de c-Met diferenciou os CPVF dos AF, com valor de $p=0,0003$, sensibilidade 93%, especificidade 50%, valor preditivo positivo 68%, e valor preditivo negativo 87%.

Tabela 3: Comparação entre a expressão proteica de c-Met nos nódulos tireoidianos.

	Com Expressão (%)	Sem Expressão (%)	Valor de p
Malignos	86,7	13,3	<0,0001
X Benignos	23,3	76,7	
CPT	96,3	3,7	0,0003
X CFT	68,2	31,8	
CPVF	93,8	6,2	0,0232
X CFT	68,2	31,8	
CPVF	93,8	6,2	0,0003
X AF	50	50	

Não encontramos nenhuma correlação entre a expressão de c-Met e qualquer das características de agressividade do tumor, como: tamanho do tumor ($p=0,0545$), invasão ($p=0,9278$), presença de cápsula ($p=0,3560$), estadiamento TNM ($p=0,7792$), metástase no diagnóstico ($p=0,8914$) ou na evolução

($p=0,1507$). No entanto, a expressão de c-Met apresentou uma relação inversa significativa para a multifocalidade, ou seja, pacientes com expressão para esta proteína não apresentaram nódulos multifocais ($p=0,0028$). A tireoidite também se correlacionou inversamente com a expressão de c-Met, já que os pacientes que possuem a expressão proteica não apresentam tireoidite ($p<0,0001$).

Tabela 4: Comparação entre a expressão proteica de c-Met com relação à multifocalidade e presença de tireoidite.

	Com Expressão (%)	Sem Expressão (%)	Valor de p
Multifocal	48,1	51,9	0,0028
Não multifocal	69,9	30,1	
Com tireoidite	54,1	45,9	<0,0001
Sem tireoidite	85,2	14,8	

4.2. Expressão STAT3

A expressão proteica de STAT3 foi observada no citoplasma e também no núcleo. A expressão citoplasmática esteve presente em todos os nódulos tireoidianos, independentemente se estes eram benignos ou malignos. Considerando-se então apenas a expressão nuclear desta proteína, STAT3 diferenciou os nódulos malignos dos benignos com valor de $p<0,0001$, sensibilidade 83%, especificidade 74%, valor preditivo positivo (VPP) 75% e valor preditivo negativo (VPN) 83%.

Uma regressão logística univariada ajustada para idade para a expressão proteica de STAT3 mostrou que a expressão desta proteína confere aproximadamente 14 vezes mais chance do desenvolvimento de um tumor benigno do que um maligno ($p < 0,0001$; OR 0,070; 95%IC 0,036 – 0,135).

A expressão nuclear de STAT3 diferenciou os CFT dos AF, com um valor de $p = 0,0457$, sensibilidade 80%, especificidade 52%, valor preditivo positivo 65%, valor preditivo negativo 71%.

A expressão nuclear de STAT3 diferenciou os bócios dos CPVF com $p < 0,0001$, sensibilidade 89%, especificidade 65%, valor preditivo positivo 91% e valor preditivo negativo 60%. Além de disso, a expressão desta proteína foi diferente nos bócios quando comparados com os CFT, $p < 0,0001$, sensibilidade 89%, especificidade 80%, valor preditivo positivo 95%, e valor preditivo negativo 60%.

Na comparação entre a expressão dos bócios e dos AF, STAT3 esteve expresso mais frequentemente nos bócios (89,3% dos casos), $p = 0,0005$, sensibilidade 89%, especificidade 80%, valor preditivo positivo 95% e valor preditivo negativo 60%. A tabela 5 resume os dados descritos acima.

Tabela 5: Comparação entre a expressão proteica de STAT3 nos nódulos tireoidianos.

	Com Expressão (%)	Sem Expressão (%)	Valor de p
Malignos X Benignos	25,6	74,4	<0,0001
	83,6	16,4	
CFT X AF	19	81	0,0457
	52,6	47,4	
Bócio X CPVF	89,3	10,7	<0,0001
	34,6	65,4	
Bócio X CFT	89,3	10,7	<0,0001
	19	81	
Bócio X AF	89,3	10,7	0,0005
	52,6	47,4	

Não houve correlação da expressão nuclear de STAT3 com os seguintes dados clínicos patológicos: tamanho do tumor ($p=0,2217$), invasão ($p=0,1145$), presença de cápsula ($p=0,2338$), estadiamento TNM ($p=0,077$), metástase no

diagnóstico ($p=0,9815$) ou na evolução ($p=0,2981$). A expressão de STAT3 correlacionou-se com multifocalidade, já que os pacientes com expressão de STAT3 apresentam frequentemente mais de um nódulo na glândula tireoide ($p<0,0001$). STAT3 também se correlacionou com a presença de tireoidite, pois os pacientes sem expressão para esta proteína geralmente não possuíam tireoidite concomitante ($p=0,0095$), como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6: Comparação entre a expressão proteica de STAT3 com relação à multifocalidade e presença de tireoidite.

	Com Expressão (%)	Sem Expressão (%)	Valor de p
Multifocal	68,7	34,3	<0,0001
Não multifocal	35,2	64,8	
Com tireoidite	52,7	47,3	0,0095
Sem tireoidite	30,3	69,7	

4.3. Expressão pSTAT3

Observamos que a expressão de pSTAT3 esteve presente no núcleo de todos os casos analisados, porém no citoplasma. A maioria dos casos apresentaram expressão positiva para esta proteína. Por esse motivo, para a análise estatística, consideramos a expressão citoplasmática para esta proteína.

A expressão de pSTAT3 não foi capaz de diferenciar os nódulos malignos dos benignos ($p=0,5364$), não diferenciou nenhum dos diferentes tipos histológicos do câncer de tireoide, e tampouco encontramos correlação com

multifocalidade ($p=1,000$), tamanho do tumor ($p=0,7121$), invasão ($p=0,4469$), presença de cápsula ($p=0,5547$), tireoidite ($p=1,000$), estadiamento TNM ($p=1,000$), metástase no diagnóstico ($p=0,6965$) ou na evolução ($p=1,000$).

4.4. Expressão de HGF

A expressão de HGF esteve presente no citoplasma de quase todos os tecidos analisados, independente se estes eram benignos ou malignos. Não houve expressão de HGF em apenas dois dos tecidos analisados (1 CPVF e 1 bócio), portanto, por não haver diferenças entre os grupos estudados e não foi possível fazer análise estatística da expressão desta proteína.

5. DISCUSSÃO

A via c-Met/HGF/STAT3 é amplamente estudada por sua relação com o desenvolvimento e a progressão tumoral, sendo responsável pelo controle da proliferação celular, adesão, mobilidade, invasão, e também, sobrevivência (26).

Nossos dados mostram que a expressão citoplasmática de c-Met foi capaz de diferenciar nódulos malignos de benignos, CPT de CFT, CPVF de CFT, assim como CPVF de AF, o que sugere que c-Met esteja envolvido com o desenvolvimento e a progressão do CPT. A regressão logística indicando que a expressão de c-Met aumenta em 17 vezes a chance de desenvolvimento de um nódulo maligno confirma tal hipótese. Além disso, a expressão se correlacionou inversamente com a presença de tireoidite e também com multifocalidade, novamente sugerindo que a proteína possa participar do processo de desdiferenciação celular.

Alguns estudos, como o de Choe e colaboradores, relatam que a expressão proteica de c-Met poderia ser um marcador clínico útil, uma vez que no câncer de cabeça e pescoço, por exemplo, a expressão dessa proteína pode ser associada com o tipo histológico do tumor e com a presença de metástases nos linfonodos. No entanto, a expressão de c-Met não se associou com idade, sexo, estágio TNM, recorrência do tumor, e histórico de tabagismo nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (69). Em relação ao câncer de tireoide, um estudo prévio mostrou expressão de c-Met em aproximadamente 70% dos CPT, porém no tecido tireoidiano normal essa expressão foi nula, ou encontrada em concentrações extremamente baixas (37).

Zanetti *et al.* no entanto apontam que a expressão de c-Met nos CPT está presente numa porcentagem maior do que esta já que foi encontrada em 97% dos casos estudados por este grupo (36), porcentagem bem próxima aos nossos achados. De fato, nós mostramos que 96% dos CPT expressavam c-Met, sugerindo que a expressão desta proteína participa do processo de tumorigênese desse tipo histológico em particular. Nosso estudo difere do de Ippolito *et al.*, no

qual não houve expressão de c-Met nos bócios e adenomas, apenas nos CPT, embora em ambos os estudos a expressão de c-Met tenha sido mais frequente nos CPT. Ippolito avaliou ainda a expressão de c-Met em lesões classificadas como suspeitas obtidas através da PAAF, nas quais a expressão proteica foi positiva em 80% dos CPT e em 30% dos CFT. Embora esta proteína não seja um bom marcador para os CF, ela auxilia na detecção dos nódulos malignos, já que é específica para câncer (70), desde que não sejam tumores pouco diferenciados (71).

Considerando a possibilidade da expressão negativa de c-Met predizer a evolução dos pacientes, Belfiore *et al.* encontraram associação com a presença de invasão vascular e também com metástase a distância no momento do diagnóstico (38). Já Ruco e colaboradores demonstraram que c-Met também estava expressa somente nos CPT, mas relataram que esta expressão pode ter sido influenciada pelo tamanho tumoral e presença de metástase nos linfonodos (71), o que difere dos nossos achados, já que em nossos casos c-Met não se associou com tamanho do tumor e presença de metástase, provavelmente porque nossos casos eram na sua maioria de estadios I, e não de estadios mais avançados da doença. Além disso, quando analisados microcarcinomas papilíferos da tireoide, a expressão de c-Met foi encontrada em 95% dos casos analisados, e a de HGF em 91% dos casos (72), demonstrando que, independentemente do tamanho do tumor, a expressão dessa proteína é encontrada precocemente no processo de carcinogênese tireoidiana.

Alguns estudos consideram que a expressão de c-Met está relacionada com pior prognóstico em carcinoma de nasofaringe, e pode também ser considerada para predizer se o paciente apresentará recorrência (73). Além disso, esta expressão tem sido relacionada com resistência as drogas utilizadas na quimioterapia de diversos cânceres (74). No câncer de mama, a expressão de c-Met faz com que a célula adquira um fenótipo mais agressivo, já que a expressão desta proteína faz com que as células migrem, sejam mais resistentes, estimulem

o crescimento, podendo indicar até mesmo o início de um processo metastático para outros tecidos. Dessa forma, para o câncer de mama, a expressão de c-Met tem sido associada como um possível marcador de pior prognóstico (75).

Em relação à associação de c-Met com tireoidite, estudos demonstram que a expressão desta proteína é reportada como uma diferenciadora de CDT, mas que, de forma interessante, esta proteína também é observada em folículos não neoplásicos, e também em tireoidite (37). De fato, Gasbarri *et al.* encontrou expressão de c-Met em pacientes com tireoidite e em alguns folículos com padrão oncocítico, mas sem evidência de malignidade (76). Tanto HGF quanto c-Met estão expressas em amostras com bócio, como em tecidos que possuem tireoidite, além de ter sido mais frequente naqueles em que apresentam tireoidite associada ao bócio (77). Em nosso estudo, a expressão de c-Met foi mais frequente nos pacientes que não apresentaram tireoidite, contradizendo a literatura, provavelmente pelo fato de nossa casuística ser composta por nódulos malignos que possuem ou não tireoidite associada, e a expressão de c-Met foi observada apenas nas células neoplásicas.

A expressão de HGF foi encontrada em praticamente todos os tecidos analisados, não sendo encontrada apenas em um CPVF e um bócio colóide. Em condrosarcomas, a expressão de HGF é encontrada em tecidos malignos quando comparados com os normais. HGF estimula a migração das células malignas, de forma que a expressão desta proteína pode estar associada com um fenótipo mais agressivo da doença (78). Nos cânceres da tireoide, a expressão de HGF foi descrita nos CPT, mas também em parte dos CFTs, sugerindo sua participação no processo da tumorigênese (79). Em nossa casuística isso não ocorreu. HGF pode ter sido recrutado pelos nódulos tireoidianos sim, mas para desempenhar seu papel de fator de crescimento dos nódulos, e não para promover a proliferação das células neoplásicas.

STAT3 diferenciou os nódulos benignos dos malignos, CFT de AF, bócios de CPVF, bócio de CFT, e bócio de AF, e se relacionou com tireoidite e multifocalidade. No entanto, a expressão de pSTAT3 não auxiliou no diagnóstico dos nódulos, e tampouco se correlacionou com as características que definem prognóstico dos pacientes.

A proteína STAT3 está ativada nas mais diversas células cancerígenas, e está associada com a tumorigênese porque a sinalização downstream ativada por ela resulta na produção de diversas citocinas e proteínas que regulam os processos de proliferação, angiogênese, sobrevivência e metástase (80). A expressão proteica de STAT3 vem sendo descrita em diversos estudos com câncer, e tem sido relacionada com a presença de metastátes nos linfonodos. Esta proteína parece ter a habilidade de promover metastátes linfáticas em diversos carcinomas. Em um estudo com câncer de mama, a expressão de STAT3 total, e também de sua forma fosforilada (pSTAT3), que é a ativa, foi diferente nos carcinomas quando comparada com o tecido adjacente ao tumor. Além disso, STAT3 se correlacionou positivamente com a presença de metastátes nos linfonodos, sendo considerada um bom marcador de prognóstico para o câncer de mama (63).

No trabalho de Ardito *et al.* (81), que utilizou apenas 18 amostras de tecidos tireoidianos (10 bócios, 2 adenomas foliculares e 6 carcinomas papilíferos), a expressão de STAT3 foi apenas citoplasmática em 8 casos, enquanto que nos demais ele observou expressão citoplasmática e nuclear, como encontrada por nós. No entanto, os dados da expressão encontrados por este grupo não foram capazes de se correlacionar com qualquer um dos tipos histológicos estudados, muito provavelmente por conta do baixo número de casos estudados por eles.

Considerando os resultados obtidos com a expressão da proteína STAT3 (total), e que a sua função implica em se translocar para o núcleo das células, regulando a transcrição de possíveis genes que participam no processo de

carcinogênese, nos perguntamos se a proteína fosforilada (funcional) pSTAT3 Y705, não estaria no núcleo das células regulando a transcrição, e impedindo as células de se transformarem em células tumorais.

No CDT, estudos de IHQ indicam que STAT3 pode ser utilizado como um possível marcador de malignidade, já que em amostras de tecidos normais da tireoide a coloração foi nula ou fraca enquanto que em CPT, aproximadamente 98% dos casos apresentaram a expressão da proteína STAT3. A forma fosforilada, pSTAT3, esteve presente em apenas 37% dos CPT. Neste mesmo estudo, Yang e colaboradores encontraram que a expressão de STAT3 e pSTAT3 se associou com a presença de metástase nos linfonodos, já que 93% dos casos que expressaram essas proteínas apresentavam metástase nos linfonodos (62). Em nossos achados, a expressão nuclear de STAT3 esteve presente principalmente nos bócios, e não nos carcinomas papilíferos. Nossos dados também não demonstraram relação da expressão de STAT3 com a presença de metástase nos linfonodos.

Não houve expressão de HGF, c-Met, STAT3 e pSTAT3 nos 9 tecidos tireoidianos normais e nos 83 nódulos benignos, porém nos 42 malignos, todas estas proteínas estavam expressas em todos os CPT estudados por Ruggeri *et al.* (79). No estudo de Trovato *et al.*, a expressão de c-Met, HGF e STAT3 foi ausente em todos os tecidos normais, e também nos CFT e nos anaplásicos, porém em todos os CPT estudados, e em 20% dos AF, houve expressão de todas as proteínas (82). Assim, a literatura sugere que a expressão proteica de c-Met, HGF, STAT3 e pSTAT3 é um marcador promissor de malignidade, principalmente de carcinomas papilíferos. Porém, nossos dados não demonstraram isso, uma vez que somente a expressão de c-Met se correlacionou com os CPT.

Em relação ao papel fisiopatológicos que estas proteínas têm, Couto e colaboradores propõem que STAT3 atue como um supressor tumoral. Eles relatam que a expressão de pSTAT3 foi encontrada nos tecidos benignos com

maior frequência, embora 56% dos CPT também tenham expressado pSTAT3 (61). Em nossos dados, STAT3 estava expressa frequentemente nos bócios, e a sua expressão pode ajudar a diferenciar os bócios de outros tipos histológicos, enquanto que pSTAT3 não se correlacionou com nenhum tipo histológico. Couto et al. relatam ainda que a pSTAT3 está associada com tamanho do tumor e presença de metástase a distância (61), o que não foi válido nos casos estudados por nós.

Quando analisamos as três proteínas como possíveis marcadores, alguns estudos demonstram que houve expressão de c-Met, STAT3 e pSTAT3 apenas nos CPT (79). O mesmo não foi visto em nosso estudo, no qual encontramos expressão citoplasmática de STAT3 em todos os tecidos analisados, enquanto que a expressão nuclear foi encontrada principalmente nos nódulos benignos, o que evidencia que STAT3 está desempenhando seu papel, e bloqueando a carcinogênese, já que ela está presente tanto no citoplasma quanto no núcleo, indicando que translocou até o núcleo para regular a expressão de genes-alvos do processo de transformação das células cancerígenas.

6. Resumo dos Achados

Em resumo,

- a. Verificamos que a expressão das proteínas c-Met e STAT3 foi diferente quando comparamos sua expressão nos nódulos malignos e benignos, já que a expressão de c-Met se associou com a presença de nódulos malignos, enquanto que STAT3 se associou com os nódulos benignos. A expressão destas proteínas auxiliou ainda na caracterização de alguns tipos histológicos dos nódulos tireoidianos. A expressão de c-Met se correlacionou com a presença de carcinomas papilíferos, principalmente com os da variante folicular quando comparado com outras lesões foliculares, podendo auxiliar no diagnóstico dos CPVF. Já a expressão de STAT3 se correlacionou com a presença de bócios quando comparados com os demais tipos histológicos do câncer de tireoide.
- b. Verificamos que a expressão das proteínas c-Met e STAT3 se correlacionou com características de agressividade do câncer de tireoide, já que a expressão de ambas as proteínas se correlacionaram com multifocalidade e também com presença de tireoidite.
- c. Verificamos que nenhuma das proteínas estudadas puderam ser indicadoras do prognóstico dos pacientes aqui estudados, já que a expressão proteica não se relacionou com a presença de metástase ao diagnóstico, nem com características de evolução dos pacientes com câncer de tireoide.

7. CONCLUSÃO

A busca por novos marcadores moleculares é imprescindível no mundo atual, principalmente por nos ajudar a prever e a tratar pacientes com diversos tipos de doenças, principalmente o câncer. Estes marcadores podem nos dar indícios de como será a evolução da doença de determinado paciente, além de responder como será a sua resposta ao tratamento, ou até mesmo, auxiliar na escolha do melhor tratamento.

Os estudos com as proteínas c-Met, HGF, STAT3 e pSTAT3 demonstram fortes indícios de que elas podem auxiliar a PAAF naqueles casos em que a citologia é considerada indeterminada, auxiliando ainda a diferenciar as lesões foliculares (CPVF, CFT e AF), que são consideradas extremamente difíceis de diferenciar até mesmo por patologistas experientes.

As proteínas c-Met e STAT3 mostraram-se úteis como marcadores moleculares, uma vez que diferenciaram os nódulos malignos dos benignos, e também diferenciaram alguns tipos histológicos dos tecidos tireoidianos, já que c-Met auxiliou na diferenciação do CPT de CFT, CPVF de CFT, assim como CPVF de AFT. A expressão de STAT3 foi mais frequente nos tecidos benignos quando comparados com os malignos, CF de AF, bócios de CPVF, bócio de CF, e bócio de AF, porém apenas c-Met e STAT3 se correlacionaram com tireoidite e multifocalidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med.* 1993;328(8):553-9.
2. American Thyroid Association Guidelines Taskforce on Thyroid N, Differentiated Thyroid C, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19(11):1167-214.
3. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(10):569-80.
4. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(5):569-77.
5. Sociedade Americana de Câncer 2013.
6. INCA. Estimativa de Câncer para o ano de 2012. 2012.
7. INCA. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. 2014.
8. Kilfoy BA, Devesa SS, Ward MH, Zhang Y, Rosenberg PS, Holford TR, et al. Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(4):1092-100.
9. Carling T, Udelsman R. Thyroid cancer. *Annual review of medicine.* 2014;65:125-37.
10. Mete O, Asa SL. Pitfalls in the diagnosis of follicular epithelial proliferations of the thyroid. *Advances in anatomic pathology.* 2012;19(6):363-73.
11. LiVolsi VA, Asa SL. The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid.* 1994;4(2):233-6.
12. Carling T, Ocal IT, Udelsman R. Special variants of differentiated thyroid cancer: does it alter the extent of surgery versus well-differentiated thyroid cancer? *World journal of surgery.* 2007;31(5):916-23.
13. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American journal of medicine.* 1994;97(5):418-28.
14. Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med.* 2004;351(17):1764-71.
15. Melillo RM, Santoro M. Molecular biomarkers in thyroid FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):4370-3.
16. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande AA, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer.* 2007;111(6):508-16.
17. Li H, Robinson KA, Anton B, Saldanha IJ, Ladenson PW. Cost-effectiveness of a novel molecular test for cytologically indeterminate thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):E1719-26.
18. Pitoia F, Ward L, Wohllk N, Friguglietti C, Tomimori E, Gauna A, et al. Recommendations of the Latin American Thyroid Society on diagnosis and management of differentiated thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(7):884-7.
19. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid

- lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagnostic cytopathology*. 2008;36(6):425-37.
20. Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, Wang H, Kebebew E, Steward DL, et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid*. 2011;21(3):243-51.
 21. Bryson PC, Shores CG, Hart C, Thorne L, Patel MR, Richey L, et al. Immunohistochemical distinction of follicular thyroid adenomas and follicular carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(6):581-6.
 22. Liu M, Ruan M, Chen L. Update on the molecular diagnosis and targeted therapy of thyroid cancer. *Medical oncology*. 2014;31(6):973.
 23. Kratky J, Vitkova H, Bartakova J, Telicka Z, Antosova M, Limanova Z, et al. Thyroid nodules: pathophysiological insight on oncogenesis and novel diagnostic techniques. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2014;63 Suppl 2:S263-75.
 24. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol*. 2004;183(2):249-56.
 25. Wagner JP, Wolf-Yadlin A, Sevecka M, Grenier JK, Root DE, Lauffenburger DA, et al. Receptor tyrosine kinases fall into distinct classes based on their inferred signaling networks. *Science signaling*. 2013;6(284):ra58.
 26. Mahtouk K, Tjin EP, Spaargaren M, Pals ST. The HGF/MET pathway as target for the treatment of multiple myeloma and B-cell lymphomas. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806(2):208-19.
 27. Lau PC, Chan AT. Novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma: HGF-MET signaling pathway. *Anticancer Drugs*. 2011;22(7):665-73.
 28. Weidner KM, Hartmann G, Naldini L, Comoglio PM, Sachs M, Fonatsch C, et al. Molecular characteristics of HGF-SF and its role in cell motility and invasion. *Exs*. 1993;65:311-28.
 29. Andermarcher E, Surani MA, Gherardi E. Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Developmental genetics*. 1996;18(3):254-66.
 30. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(6):504-16.
 31. Bozkaya G, Korhan P, Cokakli M, Erdal E, Sagol O, Karademir S, et al. Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis. *Molecular cancer*. 2012;11:64.
 32. Bhardwaj V, Cascone T, Cortez MA, Amini A, Evans J, Komaki RU, et al. Modulation of c-Met signaling and cellular sensitivity to radiation: potential implications for therapy. *Cancer*. 2013;119(10):1768-75.
 33. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011;3(1 Suppl):S7-S19.

34. Koh BI, Kang Y. The pro-metastatic role of bone marrow-derived cells: a focus on MSCs and regulatory T cells. *EMBO Rep.* 2012;13(5):412-22.
35. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(12):915-25.
36. Zanetti A, Stoppacciaro A, Marzullo A, Ciabatta M, Fazioli F, Prat M, et al. Expression of Met protein and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPA-R) in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol.* 1998;186(3):287-91.
37. Ruco LP, Stoppacciaro A, Ballarini F, Prat M, Scarpino S. Met protein and hepatocyte growth factor (HGF) in papillary carcinoma of the thyroid: evidence for a pathogenetic role in tumourigenesis. *J Pathol.* 2001;194(1):4-8.
38. Belfiore A, Gangemi P, Costantino A, Russo G, Santonocito GM, Ippolito O, et al. Negative/low expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor identifies papillary thyroid carcinomas with high risk of distant metastases. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(7):2322-8.
39. Trovato M, Villari D, Bartolone L, Spinella S, Simone A, Violi MA, et al. Expression of the hepatocyte growth factor and c-met in normal thyroid, non-neoplastic, and neoplastic nodules. *Thyroid.* 1998;8(2):125-31.
40. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science.* 1991;251(4995):802-4.
41. Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, et al. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature.* 1998;391(6664):285-8.
42. Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, et al. Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem.* 1992;267(28):20114-9.
43. Gherardi E, Stoker M. Hepatocytes and scatter factor. *Nature.* 1990;346(6281):228.
44. Maemura M, Iino Y, Yokoe T, Horiguchi J, Takei H, Koibuchi Y, et al. Serum concentration of hepatocyte growth factor in patients with metastatic breast cancer. *Cancer letters.* 1998;126(2):215-20.
45. Dremier S, Taton M, Coulonval K, Nakamura T, Matsumoto K, Dumont JE. Mitogenic, dedifferentiating, and scattering effects of hepatocyte growth factor on dog thyroid cells. *Endocrinology.* 1994;135(1):135-40.
46. Chen XP, Ren XP, Lan JY, Chen YG, Shen ZJ. Analysis of HGF, MACC1, C-met and apoptosis-related genes in cervical carcinoma mice. *Molecular biology reports.* 2014;41(3):1247-56.
47. Mineo R, Costantino A, Frasca F, Sciacca L, Russo S, Vigneri R, et al. Activation of the hepatocyte growth factor (HGF)-Met system in papillary thyroid cancer: biological effects of HGF in thyroid cancer cells depend on Met expression levels. *Endocrinology.* 2004;145(9):4355-65.
48. Peyser ND, Grandis JR. Critical analysis of the potential for targeting STAT3 in human malignancy. *Onco Targets Ther.* 2013;6:999-1010.

49. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277(5332):1630-5.
50. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002;109(9):1143-8.
51. Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*. 1999;17(3):138-46.
52. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002;285(1-2):1-24.
53. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*. 2003;197(2):157-68.
54. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):97-105.
55. Leu CM, Wong FH, Chang C, Huang SF, Hu CP. Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*. 2003;22(49):7809-18.
56. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401-4.
57. Wang Z, Zhu S, Shen M, Liu J, Wang M, Li C, et al. STAT3 is involved in esophageal carcinogenesis through regulation of Oct-1. *Carcinogenesis*. 2013;34(3):678-88.
58. Sen M, Joyce S, Panahandeh M, Li C, Thomas SM, Maxwell J, et al. Targeting Stat3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(18):4986-96.
59. Yang C, Lee H, Pal S, Jove V, Deng J, Zhang W, et al. B cells promote tumor progression via STAT3 regulated-angiogenesis. *PLoS One*. 2013;8(5):e64159.
60. Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL, Sansone P, Sasser AK, Tavolari S, et al. Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer research*. 2008;68(21):9087-95.
61. Couto JP, Daly L, Almeida A, Knauf JA, Fagin JA, Sobrinho-Simoes M, et al. STAT3 negatively regulates thyroid tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35):E2361-70.
62. Zhang J, Gill A, Atmore B, Johns A, Delbridge L, Lai R, et al. Upregulation of the signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) pathway in lymphatic metastases of papillary thyroid cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(4):356-62.
63. Chen Y, Wang J, Wang X, Liu X, Li H, Lv Q, et al. STAT3, a Poor Survival Predictor, Is Associated with Lymph Node Metastasis from Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2013;16(1):40-9.

64. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994;264(5155):95-8.
65. Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL, et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(12):3846-56.
66. Pectasides E, Egloff AM, Sasaki C, Kountourakis P, Burtness B, Fountzilas G, et al. Nuclear localization of signal transducer and activator of transcription 3 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res*. 2010;16(8):2427-34.
67. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474-81.
68. Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2010;58(2):95-107.
69. Choe JY, Yun JY, Nam SJ, Kim JE. Expression of c-Met Is Different along the Location and Associated with Lymph Node Metastasis of Head and Neck Carcinoma. *Korean J Pathol*. 2012;46(6):515-22.
70. Ippolito A, Vella V, La Rosa GL, Pellegriti G, Vigneri R, Belfiore A. Immunostaining for Met/HGF receptor may be useful to identify malignancies in thyroid lesions classified suspicious at fine-needle aspiration biopsy. *Thyroid*. 2001;11(8):783-7.
71. Ruco LP, Ranalli T, Marzullo A, Bianco P, Prat M, Comoglio PM, et al. Expression of Met protein in thyroid tumours. *J Pathol*. 1996;180(3):266-70.
72. Koo BS, Kim JM, Seo ST, Yoon YH, Kwon KR, Kim SH, et al. Upregulation of HGF and c-MET is associated with subclinical central lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(7):2310-7.
73. Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, et al. Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer research*. 2002;62(2):589-96.
74. Akervall J, Nandalur S, Zhang J, Qian CN, Goldstein N, Gyllerup P, et al. A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *European journal of cancer*. 2014;50(3):570-81.
75. Eterno V, Zambelli A, Pavesi L, Villani L, Zanini V, Petrolo G, et al. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget*. 2014;5(3):613-33.
76. Gasbarri A, Sciacchitano S, Marasco A, Papotti M, Di Napoli A, Marzullo A, et al. Detection and molecular characterisation of thyroid cancer precursor lesions in a specific subset of Hashimoto's thyroiditis. *British journal of cancer*. 2004;91(6):1096-104.

77. Ruggeri RM, Sciacchitano S, Trimarchi F, Barresi G, Trovato M. Expression of hepatocyte growth factor in Hashimoto's thyroiditis with nodular lesions. *European journal of histochemistry : EJH*. 2007;51(3):193-8.
78. Tsou HK, Chen HT, Hung YH, Chang CH, Li TM, Fong YC, et al. HGF and c-Met interaction promotes migration in human chondrosarcoma cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e53974.
79. Ruggeri RM, Vitarelli E, Barresi G, Trimarchi F, Benvenga S, Trovato M. HGF/C-MET system pathways in benign and malignant histotypes of thyroid nodules: an immunohistochemical characterization. *Histol Histopathol*. 2012;27(1):113-21.
80. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(1):41-51.
81. Ardito G, Revelli L, Boninsegna A, Sgambato A, Moschella F, Marzola MC, et al. Immunohistochemical evaluation of inflammatory and proliferative markers in adjacent normal thyroid tissue in patients undergoing total thyroidectomy: results of a preliminary study. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2010;29:77.
82. Trovato M, Grosso M, Vitarelli E, Ruggeri RM, Alesci S, Trimarchi F, et al. Distinctive expression of STAT3 in papillary thyroid carcinomas and a subset of follicular adenomas. *Histol Histopathol*. 2003;18(2):393-9.