

**MARIANA BONJIORNO MARTINS**

**ANÁLISE DO PERFIL DAS PROTEÍNAS MAGE A3, P53, MDM2 E KAP-1 NA  
IDENTIFICAÇÃO DE MALIGNIDADE E NA CARACTERIZAÇÃO DE  
LESÕES TIROIDIANAS DE PADRÃO FOLICULAR**

**ANALYSIS OF PROTEIN PROFILE MAGE A3, P53, MDM2 AND KAP-1 IN  
MALIGNANCY IDENTIFICATION AND IN THE CHARACTERIZATION OF  
THYROID FOLLICULAR LESIONS**

**CAMPINAS**

**2012**

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

MARIANA BONJIORNO MARTINS

ANÁLISE DO PERFIL DAS PROTEÍNAS MAGE A3, P53, MDM2 E KAP-1 NA  
IDENTIFICAÇÃO DE MALIGNIDADE E NA CARACTERIZAÇÃO DE  
LESÕES TIROIDIANAS DE PADRÃO FOLICULAR

ANALYSIS OF PROTEIN PROFILE MAGE A3, P53, MDM2 AND KAP-1 IN  
MALIGNANCY IDENTIFICATION AND IN THE CHARACTERIZATION OF  
THYROID FOLLICULAR LESIONS

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

Dissertation submitted to the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - UNICAMP for the title of Master of Science.

**Orientadora: Dra. Laura Sterian Ward**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA BONJIORNO MARTINS E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD.



Assinatura do (a) Orientador (a)

CAMPINAS, 2012



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROSANA EVANGELISTA PODEROSO –  
CRB8/6652**

**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP**

Martins, Mariana Bonjiorno 1985 -	
M366a	Análise do perfil das proteínas MAGE A3, P53, MDM2 e KAP - 1 na identificação de malignidade e na caracterização de lesões tiroidianas de padrão folicular / Mariana Bonjiorno Martins. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.
	Orientador : Laura Sterian Ward.
	Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Analysis of protein profile MAGE A3, P53, MDM2 and KAP-1 in malignancy identification and in the characterization of thyroid follicular lesions.

**Palavras-chave em inglês:**

Thyroid Neoplasms

Cell cycle

Diagnostic

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestre em Ciências

**Banca examinadora:**

Laura Sterian Ward [Orientador]

André Almeida Schenka

Hans Graf

**Data da defesa:** 23-07-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

**Mariana Bonjorno Martins**

---

---

Orientador: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

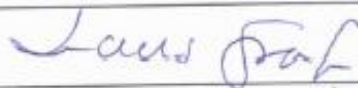
---

---

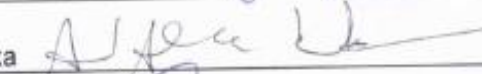
### Membros:

---

1. Prof. Dr. Hans Graf



2. Prof. Dr. André Almeida Schenka



3. Profa. Dra. Laura Sterian Ward



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

---

Data: 23/07/2012

---

Dedico esta tese aos meus pais: **Rogeria e Marcos**, pelo apoio, encorajamento, amor e ensinamentos que foram alicerces em minha vida. Vocês são minhas maiores inspirações.

Amo Vocês.

À minha irmã: **Bruna**, por estar sempre comigo, me ouvindo, me apoiando, sendo minha grande amiga.

Amo você pequena.

Ao meu avô: **José Bongiorno** (*in memoriam*) grande incentivador de meus estudos e um querido avô.

Sinto sua falta.

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Á Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, mostrando os caminhos certos nas horas incertas e por me suprir em todas as minhas necessidades !!

Á minha orientadora Profa. Dra. Laura Sterian Ward, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela pessoa que é, e pelo seu dom no ensino e pesquisa da Ciência, contribuindo para dias melhores. Muito Obrigada por ter me aceito como sua filha científica !!

A minha mãe, Rogeria pelo enorme incentivo em minha carreira, por acreditar fielmente em mim, e por ter contribuído em minha educação. Você é uma grande mulher, uma grande mãe, guerreira, batalhadora, a minha grande heroína. Este trabalho é fruto de todas as palavras de incentivo e amor que você me proporcionou.

Ao pai, Marcos por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, pai dedicado, amigo, batalhador, que abriu mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho.

Á minha irmã, Bruna, por longas conversas, por ter ouvido tantas vezes sobre este trabalho, por dividir comigo alegrias e tristeza, você é minha irmã, minha amiga, tenho muito orgulho de você e sei que sua carreira será brilhante.

A minha avó, Maria, por acreditar que sua neta pode ser tudo o que ela desejar e por fazer de mim uma grande profissional aos seus olhos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA): Rita, Helvia, Natássia, Carolina, Raquel, Aline Carolina, Angélica, Jacqueline, Fernando e Renata. Agradeço por terem me recebido no grupo, pelos grandes momentos de felicidades, pelos ombros amigos nas dificuldades, pelos ensinamentos e pelas trocas de experiências, pela diversão e carinho. Um agradecimento e especial à Elaine e Lucas. Elaine obrigada por tudo, por me ensinar e por dividir sua sabedoria comigo !! Lucas obrigada por cada explicação por cada momento de alegria e pelo incentivo ao longo do tempo !! Vocês são grandes amigos.

Á Marjory, um agradecimento mais que especial, por ter me recebido no Gemoca, pelos incentivos, encorajamento e sabedoria ao longo desse tempo para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por ter dividido minhas angustias e alegrias em minha vida profissional e pessoal, você é minha amiga/irmã e este mestrado só existe por que você sempre esteve ao meu lado. E muito do que me tornei durante esse período devo a você. Não tenho palavras para te agradecer amiga. Amo muito !!

Ao Hospital A. C Camargo, pela referencia como centro de pesquisa e por todo seu comprometimento com seus pacientes. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por ter disponibilizado os TMAs para este estudo.

Á Fabio Schmidt, por ser um dos meus pilares de sustentação para a conclusão dessa pesquisa, você foi fundamental para o desenvolvimento e finalização desse estudo

através de sua compreensão e paciência. Muito obrigado por ter entrado na minha vida.

Amo-te !!!

Ao Prof. Dr. Jose Vassallo do Laboratório de Investigação em Patologia e seu técnico Dr. Paulo Latuf Filho, pela ajuda com meus anticorpos e com a imunoistoquímica.

As minhas amigas e amigos Aline, Priscila, Thatiane e Felipe, por sempre me apoiarem, por acreditarem em mim, por vibrarem por cada conquista e me acolherem nos momentos difíceis e acima de tudo serem meus amigos verdadeiros e companheiros, que nem mesmo a distancia pode separar !!

A toda minha família e amigos que de forma direta ou indireta lutaram comigo por este trabalho.

Á FAPESP, pelo apoio financeiro e pela bolsa para a realização deste trabalho.

*"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."*

**Rui Barbosa.**

As lesões tiroidianas de padrão folicular constituem cerca de 30% das lesões de tireoide e são um grande problema clínico já que incluem condições benignas e malignas. Isso obriga aos pacientes que são candidatos potenciais a realizarem cirurgia, que se mostra desnecessária em 70% das citologias indeterminadas que, no exame histológico, revelam serem lesões benignas. Os antígenos de Câncer de Testículos possuem como membro MAGE A3, uma proteína específica envolvida na regulação da apoptose e na progressão do ciclo celular. O gene *TP53* é um supressor tumoral, sua proteína p53 possui uma participação fundamental no controle do ciclo celular, reparação do DNA e ativação da apoptose, e é responsável pela transcrição da *MDM2*, que inibe as funções transcritoras de p53 e produz retroalimentação negativa. A proteína KAP-1 pode atuar como uma co-repressora de p53 ao se ligar a MAGE A3 e a *MDM2* e ele tem sido implicado em diversos processos celulares, tais como o desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica. Objetivamos neste trabalho, analisar a expressão de MAGE A3, P53, *MDM2* e KAP-1 como possíveis marcadores de diagnóstico e prognóstico para Câncer Diferenciado de Tireoide. Utilizamos imunistoquímica para avaliar expressão das proteínas. Foram investigados 364 pacientes com nódulos de tireoide (tecidos malignos e benignos). A expressão de todas as proteínas identificou malignidade ( $p < 0.0001$ ) e também pode diferenciar algumas lesões de padrão folicular. A expressão proteica de MAGE A3, P53, *MDM2* e KAP-1 se associaram com aspectos clínicos e patológicos de agressividade, porém somente KAP-1 se correlacionou com recidiva tumoral, mas não com a sobrevida dos pacientes. Nossos dados sugerem que a expressão de MAGE A3, P53, *MDM2* não é boa marcadora de recidiva, mas todas as proteínas podem auxiliar no diagnóstico diferencial das lesões foliculares da tireoide e



confirmar malignidade, podendo ser útil como parte de um painel de marcadores que auxiliam no diagnóstico para câncer diferenciado da tireoide.

## ***ABSTRACT***

---

The lesions of thyroid follicular constitute about 30% of thyroid lesions and are a major clinical problem since they include benign and malignant conditions. This requires patients who are potential candidates to perform surgery, which appears unnecessary in 70% of indeterminate cytology that the histological examination revealed to be benign. The antigens Cancer Testis have member as MAGE A3, a specific protein involved in regulation of apoptosis and cell cycle progression. The TP53 is a tumor suppressor, its protein p53 has a fundamental role in cell cycle control, DNA repair and activation of apoptosis, and is responsible for transcription of MDM2, which inhibits the functions of p53 transcribers and produces negative feedback. The KAP-1 protein can act as a co-repressor of p53 to bind to MDM2 and MAGE A3 and it has been implicated in diverse cellular processes such as development, differentiation and neoplastic transformation. This paper sets to analyze the expression of MAGE A3, P53, MDM2 and KAP-1 as potential markers for diagnosis and prognosis of Differentiated Thyroid Cancer. We used immunohistochemistry to evaluate protein expression. We investigated 364 patients with thyroid nodules (malignant and benign tissue). The expression of all proteins identified malignancy ( $p < 0.0001$ ) and also can differentiate between some follicular lesions. Protein expression of MAGE A3, P53, MDM2 and KAP-1 were associated with clinical and pathological aggression, but only KAP-1 correlated with tumor recurrence, but not with patient survival. Our data suggest that the expression of MAGE A3, P53, MDM2 is not a good marker of recurrence, but all proteins may help in the differential diagnosis of follicular thyroid lesions and to confirm malignancy and may be useful as part of a panel of markers that help diagnosis of differential thyroid cancer.

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

AF	Adenomas Foliculares
AGES	do inglês - Age, Grade, Extracapsular spread, and Size
AMES	do inglês - Age, Metastasis, Extracapsular tumor, and Size
BRAF	do inglês V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
CDT	Os Carcinomas Diferenciados da Tiroide
CFT	Carcinomas Foliculares da Tiroide
CMT	Carcinomas Medulares da Tiroide
CPT	Carcinomas Papilíferos da Tiroide
CPCT	Carcinomas Papilíferos Clássicas da Tiroide
CPVCA	Carcinomas Papilíferos Variantes de Células Altas
CPVF	Carcinoma Papilífero de Variante Folicular
CTA	Antígenos de Câncer de Testículos
DAB	3,3 Tetrahydrocloroeto-diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
EORTC	do inglês – European Organization for Research on Treatment of Cancer

GEMOCA	Laboratório de Biologia Molecular do Câncer
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KAP-1	do inglês – Kinesin II Associated Protein
MACIS	do inglês - Metastasis, Age, Completeness of resection, Invasiveness, Size of tumor
MAGE	do inglês – Melanoma Antigen Family
MAGE A	do inglês – Melanoma Antigenfamily A
MAGE B	do inglês – Melanoma Antigen Family B
MAGE C	do inglês – Melanoma Antigen Family C
MAGE A3	do inglês – Melanoma Antigen Family A, 3
MDM2	do inglês – Murine Doble Minute 2)
p53	do inglês – Protein p53
PCI	Pesquisa de Corpo Inteiro
RNAM	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SUS	Sistema Único de Saúde
Tg	Tireoglobulina
TMA	Tissue Microarray

TNM	do inglês - Tumor Size, Nodes, Metastasis
TP53	do inglês – Tumor Protein p53
TRIM	do inglês – Tripartite Motif Containing
TRIM 28	do inglês – Tripartite Motif Containing 28
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide
UICC	do inglês - International Union Against Cancer
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

## ***LISTA DE TABELAS***

---

Tabela 1. Análise descritiva dos dados clínicos e histopatológicos dos pacientes estudados. Os dados estão expressos em número absoluto e classificados de acordo com o gênero: M masculino; F-feminino e de acordo com a idade.....	42
Tabela 2. Especificações dos marcadores imunoistoquímicos.....	45
Tabela 3. Classificação do carcinoma da tireoide de acordo com a 7ª edição da UICC ( <i>International Union Against Cancer</i> ).....	49
Tabela 4. Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa de MAGE A3.....	59
Tabela 5. Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa de P53.....	64
Tabela 6. Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa de MDM2.....	70
Tabela 7. Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa de KAP-1.....	76

## ***LISTA DE FIGURAS***

---

---

Figura 1. Estimativa de incidência dos tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma. Extraído de Inca, disponível em: <a href="http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/">www.inca.gov.br/estimativa/2012/</a> .....	25
Figura 2. Taxa de incidência de câncer de tireoide em homens segundo município. Taxa ajustada por idade.....	26
Figura 3. Taxa de incidência de câncer de tireoide em mulheres segundo município. Taxa ajustada por idade.....	27
Figura 4. Via de ativação de p53 modificado de Whibley C <i>et al</i> , 2009 (39).....	32
Figura 5. Realização da apoptose, modificado de Teabald M <i>et al</i> , 2003 (52).....	33
Figura 6. Interação das proteínas MAGE A3, KAP-1 e MDM2 para a inativação de p53.....	36
Figura 7. Painel de células com expressão negativa e positiva para as proteínas estudadas. (A1) MAGE A3 negativo e (A2) MAGE A3 positivo (20x). (B1) KAP-1 negativo e (B2) KAP-1 positivo (40x). (C1) MDM2 negativo e (C2) MDM2 positivo (40x). (D1) P53 negativo e (D2) P53 positivo (40x).....	48
Figura 8. Expressão proteica de MAGE A3 em Adenoma Folicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Folicular (D) e Carcinoma Folicular (E) (Aumento de 20x).....	51

Figura 9. Expressão proteica de p53 em Adenoma Folicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Folicular (D) e Carcinoma Folicular (E) (Aumento de 40x).....	52
Figura 10. Expressão proteica de MDM2 em Adenoma Folicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Folicular (D) e Carcinoma Folicular (E) (Aumento de 40x).....	53
Figura 11. Expressão proteica de KAP-1 em Adenoma Folicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Folicular (D) e Carcinoma Folicular (E) (Aumento de 40x).....	54
Figura 12. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MAGE A3 em tecidos malignos <i>versus</i> benignos.....	60
Figura 13. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MAGE A3 em CF <i>versus</i> AF.....	61
Figura 14. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MAGE A3 em CPVF <i>versus</i> AF.....	62
Figura 15. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em tecidos malignos <i>versus</i> benignos.....	65
Figura 16. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em CPVF <i>versus</i> AF.....	66



Figura 17. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em CPVF <i>versus</i> CF.....	67
Figura 18. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em CPVF <i>versus</i> H.....	67
Figura 19. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MDM2 em tecidos malignos <i>versus</i> benignos.....	71
Figura 20. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MDM2 em CF <i>versus</i> AF.....	71
Figura 21. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MDM2 em CPVF <i>versus</i> AF.....	72
Figura 22. Correlação de P53 e MDM2, nos tecidos tiroidianos benignos.....	73
Figura 23. Correlação de P53 e MDM2, nos tecidos tiroidianos malignos.....	73
Figura 24. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de KAP-1 em tecidos malignos <i>versus</i> benignos.....	77
Figura 25. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de KAP-1 em CF <i>versus</i> AF.....	78

Figura 26. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de KAP-1 em CPVF *versus* AF.....78

# *SUMÁRIO*

---

---

Páginas

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	22
1.1 Câncer de Tiroide	23
1.2 MAGE A3	29
1.3 P53	31
1.4 MDM2	32
1.5 KAP-1	34
1.6 Relações de MAGE A3, KAP-1 e MDM2 com p53	35
<b>2. OBJETIVOS</b>	38
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
3.1 Casuística	41
3.2 Construção do microarranjo de tecidos tissue microarray (TMA)	43
3.3 Imunoistoquímica (IHQ)	44
3.4 Avaliação Imunoistoquímica	45

3.5 Estadiamento dos tumores dos pacientes da lâmina de Tissue Microarray(TMA)	49
3.6 Análises da expressão proteica de MAGE A3, KAP-1, MDM2 e p53 através da Imunoistoquímica	50
3.7 Análise Estatística	55
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>56</b>
4.1 Análise da utilidade clinica de MAGE A3 no diagnóstico e prognóstico destes pacientes.	57
4.2 Análise da utilidade clinica de P53 no diagnóstico e prognóstico destes pacientes.	62
4.3 Análise da utilidade clinica de MDM2 no diagnóstico e prognóstico destes pacientes.	68
4.4 Análise da utilidade clinica de KAP-1 no diagnóstico e prognóstico destes pacientes.	74
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>80</b>
<b>6. RESUMO DOS ACHADOS</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>88</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>90</b>

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer (GEMOCA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a coordenação da Prof. Dra. Laura Sterian Ward em colaboração com o Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C Camargo, coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Augusto Soares e com o Laboratório Investigativo de Patologia Molecular, coordenado pelo Prof. Dr. José Vassallo. O projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C Camargo em adendo a outro projeto de pesquisa tendo recebido parecer favorável nº 1259/09-C.

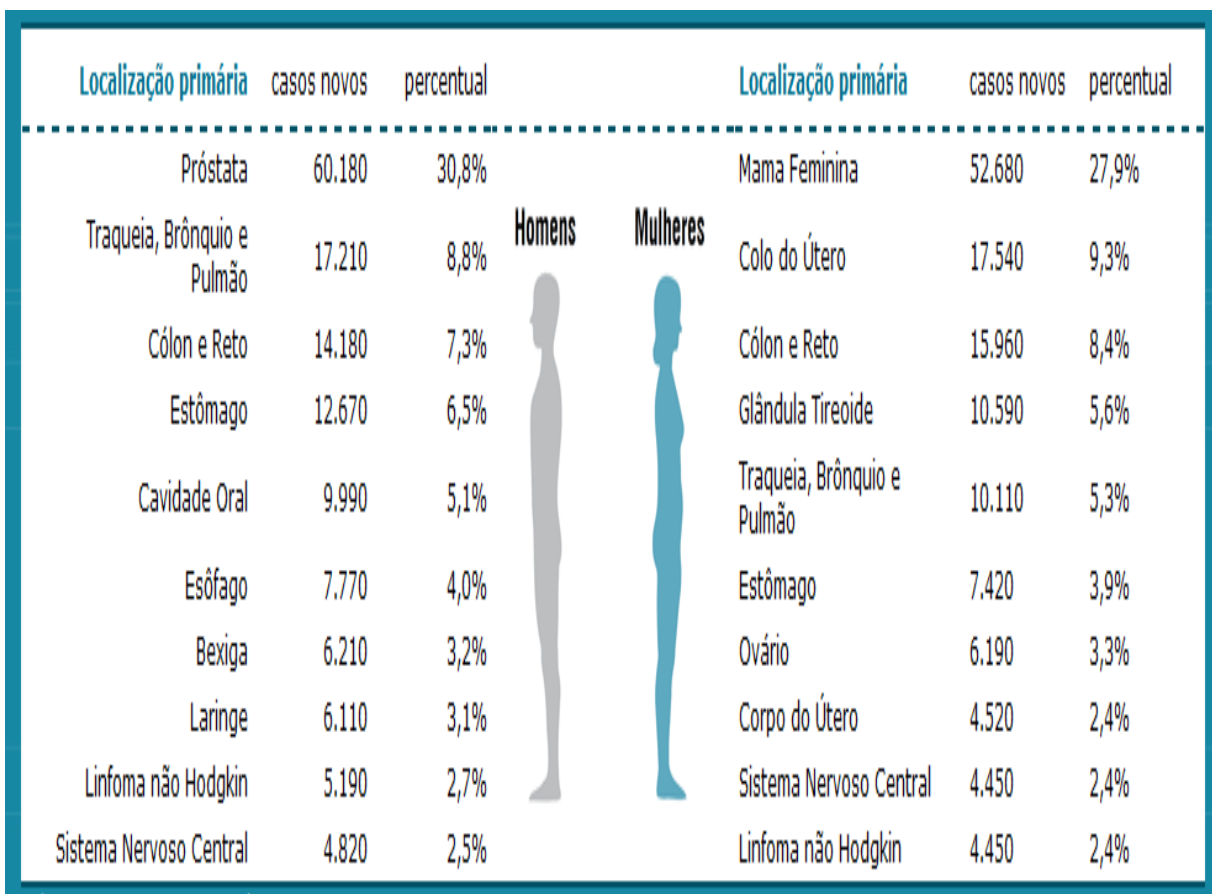
### **Câncer de Tiroide**

Os nódulos tiroidianos são detectáveis em aproximadamente 4-7% dos indivíduos submetidos à palpação e na metade da população examinada por ultrassonografia (US). Além disso, dados relativos a US apontam que os nódulos tiroidianos acometem cerca de 90% das mulheres acima de 70 anos e cerca de 80% dos homens acima de 80 anos (1, 2, 3,4). Encontrar um nódulo de tiroide sempre traz a ameaça de se tratar de um câncer.

O câncer de tiroide representa mais de 2% de todas as neoplasias humanas e sua incidência tem aumentado continuamente em muitas regiões do mundo nas últimas décadas (5). Os Carcinomas Diferenciados da Tiroide (CDT) são derivados das células foliculares e subdivididos em dois grupos: Carcinomas Papilíferos (CPT), que representam cerca de 80% de todos os tipos de cânceres de tiroide; e Carcinomas Foliculares (CFT) que representam cerca de 13%. Os Indiferenciados ou Anaplásicos constituem menos de 4% dos carcinomas tiroidianos. As células parafoliculares, produtoras de calcitonina, são responsáveis por menos de 3% dos carcinomas tiroidianos, dando origem aos Carcinomas Medulares (CMT).

Das células foliculares também derivam as lesões benignas como o Adenoma Folicular e o Bócio (6).

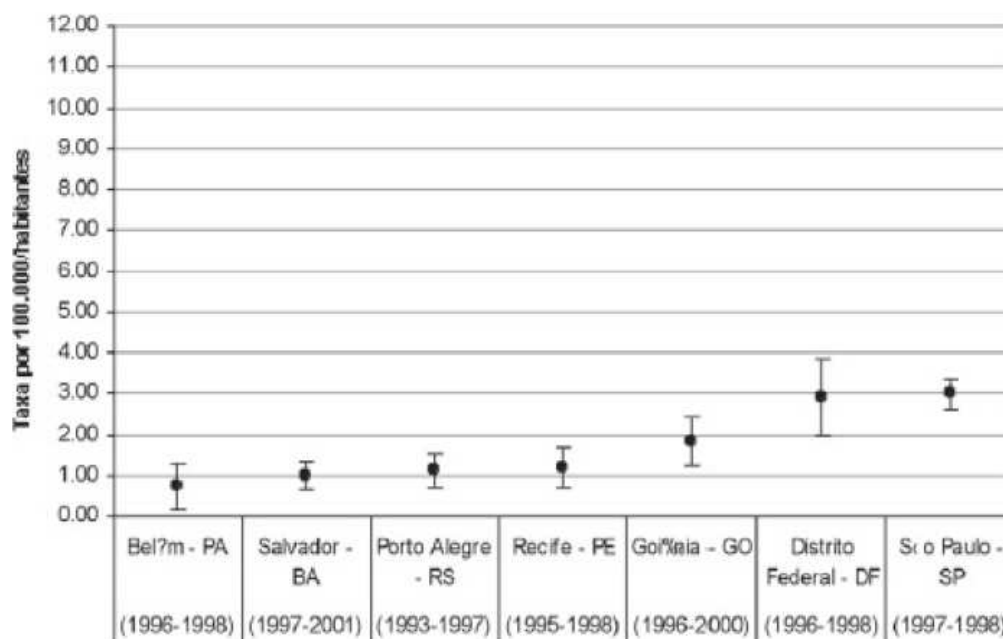
O CDT é a neoplasia endócrina mais comum, sendo considerado responsável por 1.740 mortes nos Estados Unidos da América (EUA), onde cerca de 48.020 novos casos foram diagnosticados em 2011 (7). No Brasil, o câncer da tireoide vem aumentando sua incidência, assim como no resto do mundo (8) e continua responsável por uma considerável taxa de morbidade, já que recorrências ocorrem em cerca de um terço dos casos (9). Dados recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA) colocam o CDT como o câncer mais comum de cabeça e pescoço, projetando esse tumor como o quarto mais frequente entre mulheres no ano de 2012 (Figura 1) (10). O Inca estima que o câncer de tireoide tenha sido responsável por 12,9% de todas as neoplasias registradas no sexo feminino e por 3,2% das neoplasias do sexo masculino em 2009 (10). Espera-se que 10.590 casos novos de câncer da tireoide em 2012, com um risco estimado de 11 casos a cada 100 mil mulheres (10).



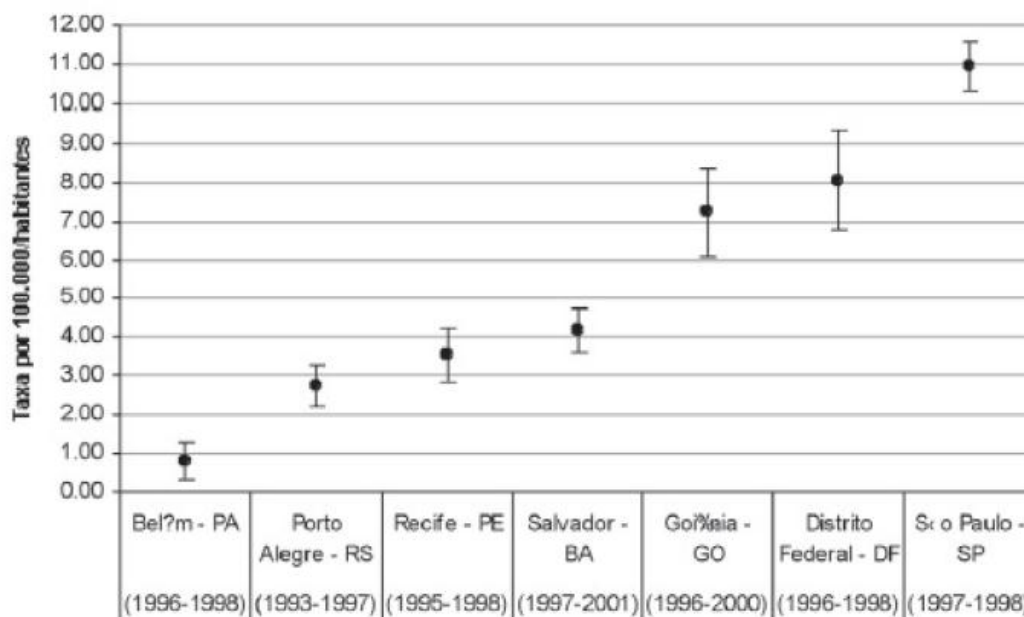
**Figura 1.** Estimativa de incidência dos tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma. Extraído de Inca, disponível em: [www.inca.gov.br/estimativa/2012/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/).



Dados brasileiros também mostram uma grande variedade na incidência desse câncer em diversos estados do país (11). Parte desta variedade deve estar relacionada ao melhor acesso ao Sistema Único de Saúde (SUS) e a melhores meios de diagnóstico, como no Estado de São Paulo (11). No entanto, observa-se também uma grande variedade em outros Estados de similar nível sócio econômico-cultural e similar qualidade de serviços de atendimento em saúde, indicando que outros fatores também devem contribuir para tal divergência na incidência (Figura 2 e 3) (12).



**Figura 2.** Taxa de incidência de câncer de tireoide em homens segundo município. Taxa ajustada por idade.



**Figura 3.** Taxa de incidência de câncer de tireoide em mulheres segundo município. Taxa ajustada por idade.

Células foliculares de tumores papilíferos e foliculares possuem semelhança estrutural e funcional com as células foliculares normais, o que explica em grande parte a sua boa resposta a cirurgia e ao radioiodo, que continua a ser captado pela grande maioria das células foliculares neoplásicas. Essas características podem, entretanto, complicar o diagnóstico dos tumores tireoidianos, principalmente os de padrão folicular, que acabam sendo classificados como “indeterminados” ou Bethesda 3 ou 4 (13). Aproximadamente 20-30% dos nódulos submetidos à aspiração por agulha fina (PAAF) têm achados citológicos “indeterminados”, um padrão que se manteve praticamente inalterado ao longo das últimas duas décadas. Todos esses pacientes são atualmente encaminhados para a cirurgia para

definir a natureza dos nódulos (8), porém, esta se revela desnecessária em cerca de 70-80% destes pacientes, cujas lesões são histologicamente benignas (3,4,14).

Além disso, a tendência ascendente na incidência de CDT registrada em todo o mundo é principalmente devido a pequenos ou muito pequenos (micro) CPTs, cujo significado clínico ainda é incerto, e que pode explicar, pelo menos em parte, a baixa mortalidade por CDT (5,15). Por outro lado, 5-15% dos CDTs evoluem com recidivas e podem tornar-se insensíveis à terapia com radioiodo, eventualmente, contribuindo para a taxa de mortalidade pela doença que causou 1,690 obitos registrados em 2010 no EUA (16).

Uma série de sistemas de classificação baseados em características clínicas, patológicas e moleculares, como AMES (do inglês - Age, Metastasis, Extracapsular tumor, andSize), AGES (do inglês - Age, Grade, Extracapsular spread, andSize), MACIS (do inglês - Metastasis, Age, Completeness of resection, Invasiveness, Sizeof tumor), TNM(do inglês - Tumor size, Nodes, Metastasis), e EORTC (do inglês – European Organization for Researchon Treatmentof Cancer), estão sendo usados para prever o prognóstico e orientar as estratégias de tratamento cirúrgico e clínico (17,18,19).

Alguns marcadores moleculares, especialmente a mutação BRAF (do inglês - v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b1), parecem muito promissores como auxiliares na determinação de progressão potencial em tumores tiroidianos (20). No entanto, no estado atual do conhecimento, esses marcadores ainda não são poderosos o suficiente para prever a necessidade de tratamento mais agressivo (21,22,23).

Marcadores moleculares de diagnóstico podem ser úteis, em particular, no caso das lesões de padrão folicular que incluem doenças benignas que poderiam não ser submetidas à cirurgia (como a hiperplasia e o adenoma folicular), mas também lesões malignas, como a variante folicular do carcinoma papilífero (CPVF) e, mais raramente, no carcinoma folicular. Estas lesões podem ser de difícil diagnóstico diferencial mesmo para os mais experientes patologistas, de modo que o uso de marcadores moleculares pode ajudar na tomada de decisão (24). Já marcadores de prognóstico podem ser úteis não apenas na definição da melhor estratégia terapêutica inicial como também no seguimento de pacientes com câncer de tireoide, podendo servir para a indicação de terapia alvo-dirigida nos 10 a 15% casos que evoluem com progressão rápida e agressiva do CDT, e, sobretudo, poupando de condutas mais agressivas os casos de melhor evolução (25).

O destino de uma célula, no que diz respeito a sua transformação maligna e a sua capacidade de invasão e agressividade, é determinado por inúmeras moléculas em diversas vias intracelulares pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, das quais participam MAGE A3, p53, MDM2 e KAP-1.

## **1.2 MAGE A3**

Os Antígenos de Câncer de Testículos (CTA) se encontram expressos restritamente as células germinativas dos testículos e placenta, mas muitos de seus membros se encontram expressos em uma grande variedade de tumores malignos. Atualmente mais de 100 CTAs divididos em famílias, já foram descritos na literatura e seu número continua crescente (26). Embora mais de 100 destas enzimas já estejam descritas na literatura, não se sabe muito sobre suas funções (27). Apesar da maioria dos CTAs não ter função biológica

específica conhecida, seu envolvimento na sinalização, transcrição, translação e recombinação cromossomal tem sido proposto (28, 29). Também tem sido proposto que a expressão aberrante dos CTAs em tumores esteja relacionada a algumas características do fenótipo neoplásico tais como imortalidade, invasão, evasão imune e capacidade metastática (29,30).

As famílias de CTA estão divididas nos genes codificados no cromossomo X e nos codificados fora do cromossomo X (29). No tumor, estas células favorecem a manutenção, proliferação e metástase das células cancerígenas (31).

A maior família de enzimas CTAs e uma das mais importantes e a família MAGE (do inglês – melanoma antigen family). A família MAGE esta dividida em MAGE Classe Tipo I e MAGE Classe Tipo II que se encontram dentro do cromossomo X (29). MAGE Classe Tipo I possui como membros MAGE A (do inglês – melanoma antigen family A), MAGE B (do inglês – melanoma antigen family B) e MAGE C (do inglês – melanoma antigen family C). A classe MAGE A merece destaque, pois muito de seus membros se encontram expressos em melanomas e em outras malignidades solidas (29).

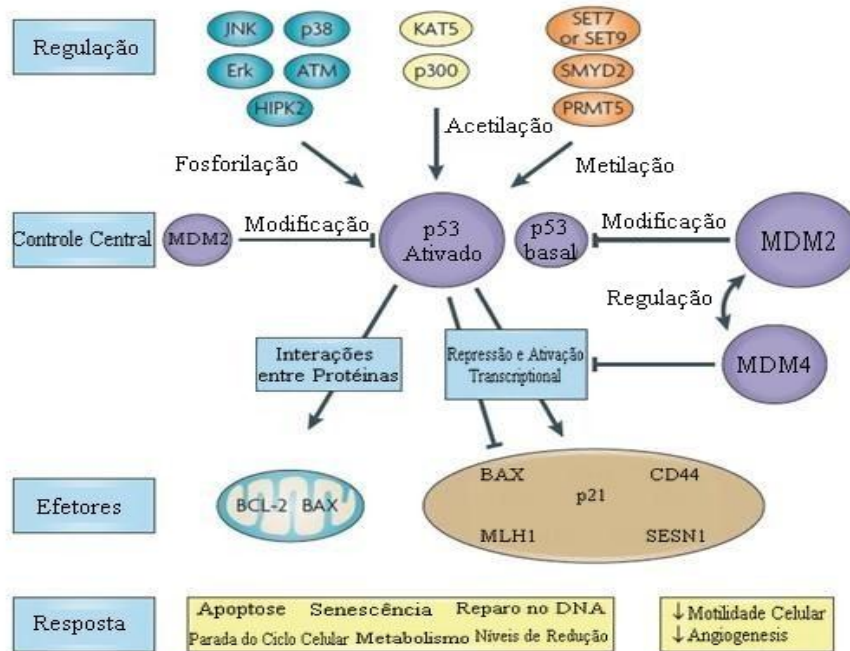
A família dos genes *MAGE A* é composta de 15 membros classificados de A1 a A15 (32,33). Os membros da família MAGE A estão envolvidos na resistência a apoptose e na progressão do ciclo celular. MAGE A3 (do inglês – melanoma antigen family A, 3) é um membro de MAGE A que está localizado no cromossomo X na região q28. MAGE A3 tem sido estudado e utilizado em ensaios de imunoterapia em diversos tipos histológicos de cânceres pelo fato de reconhecerem Linfócitos T (34, 35). Em células tumorais, estes genes são ativados de forma anormal devido à desmetilação dos seus promotores, o que ocorre em

muitos cânceres (27). A expressão anormal do gene *MAGE-A3* tem sido observada em melanoma, carcinoma de pulmão, cabeça, pescoço, leucemia, carcinoma de células escamosas, mama, mieloma múltiplo, astrocitoma, tumores de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma colorretal, osteosarcoma e tireoide (27, 32, 36, 37). No entanto há poucos estudos em câncer de tireoide.

### **1.1 P53**

O gene *TP53* (do inglês – tumor protein p53) é um gene supressor tumoral (38), localizado no braço curto do cromossomo 17. Sua proteína tem participação fundamental no controle do ciclo celular, na reparação do DNA e na ativação da apoptose (39).

A perda da função de p53 (do inglês – protein p53) é um evento crítico da tumorigênese e aproximadamente metade dos cânceres humanos apresentam essa alteração (40). A proteína p53 atua na regulação do ciclo celular, na transição de G0 para G1. Quando ativada ela leva a uma parada do ciclo celular em G1, para que assim os danos sejam reparados. Outra importante função de p53 é a de apoptose. Se os reparos não forem possíveis por causa de um dano muito grave ao DNA (ácido desoxirribonucleico), p53 induz a uma cascata de sinais que levam esta célula a uma morte programada, impedindo-a de qualquer vantagem de crescimento para suas células filhas (41).



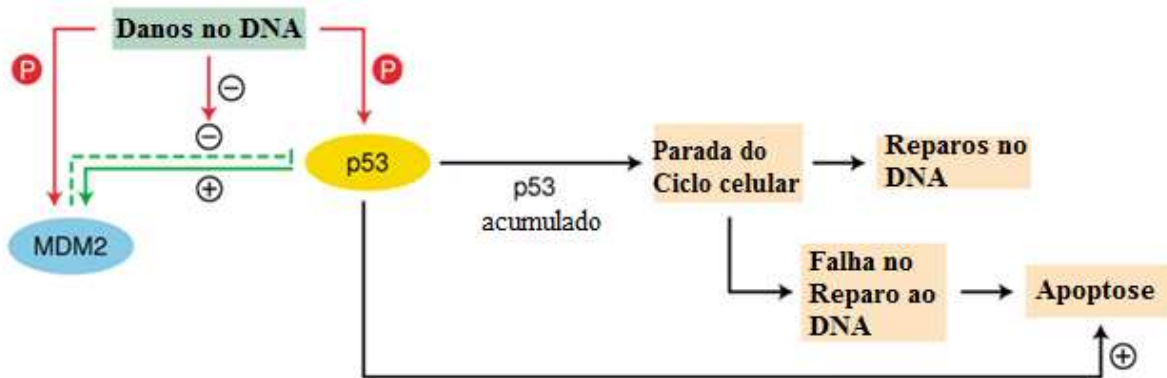
**Figura 4.** Via de ativação de p53 modificada de Whibley C *et al*, 2009 (38).

Acredita-se que TP53 participe das etapas finais do processo de carcinogênese tireoidiana e nos tumores pouco diferenciados, nos anaplásicos e nos mais agressivos, onde ele se encontra frequentemente mutado (41) Quando mutado, *TP53* causa aumento da expressão da proteína p53, que tem sido correlacionada com tumores maiores e com a presença de metástases linfonodais (41, 42, 43). No entanto, alguns trabalhos recentes vêm relatando uma alta expressão da proteína p53 em CPT (44,45).

#### 1.4 MDM2

P53 é responsável pela transcrição de MDM2 (do inglês – murine double minute 2), que inibe as funções transcritoras de p53 e produz retroalimentação negativa. O mecanismo de inibição da p53 é predominante quando a célula está livre de estresse e faz com que os

níveis celulares de p53 fiquem baixos, impedindo a parada do ciclo celular (46). Quando ocorrem danos ao DNA, Mdm2 e p53 são fosforiladas, diminuindo sua associação e permitindo que p53 possa realizar suas funções corretamente (Figura 5) (47).



**Figura 5.** Realização da apoptose, modificado de Teabald M *et al*, 2003 (47).

O excesso inapropriado de MDM2 poderia inativar p53 em demasia, impedindo suas ações supressoras tumorais e conseqüentemente colaborando para a carcinogênese. De fato, uma fração dos tumores humanos tem superexpressão do RNAm (Ácido Ribonucléico mensageiro) e da proteína MDM2, o que se tem associado à progressão acelerada do câncer, falta de resposta à terapia e um pior prognóstico (48).

O gene Mdm2 também podem ser classificados como um oncogene com base no seu comportamento em tumores humanos. A superexpressão de MDM2 é encontrada em uma ampla variedade de tumores humano, devido a um dos três mecanismos: amplificação do gene, aumento da transcrição ou uma melhor tradução (48).



Há evidências de que a superexpressão de MDM2 pode estar ligada também aos carcinomas papilíferos (49). Um primeiro estudo mostrou a ocorrência de imunopositividade de MDM2 em 33% dos carcinomas papilíferos estudados, mas nenhuma positividade para os nódulos benignos e a tiroide normal (50). Num segundo estudo, apesar de terem sido encontradas associações entre a expressão de p53 com o tamanho e grau de invasão do tumor, nenhuma associação pôde ser feita entre a expressão de MDM2 e as características clínico-patológicas (49).

Em um trabalho comparando através de Tissue Microarray a expressão de várias proteínas envolvidas no controle celular, não foi encontrada uma diferença significativa de expressão de MDM2 entre as células de carcinomas diferenciados e outras lesões benignas na tiroide (42). Em resumo, a literatura existente sobre o gene *MDM2* em câncer de tiroide ainda é restrita e inconclusiva.

## **1.5 KAP-1**

KAP-1 (do inglês – kinesin II associated protein) é membro de uma família de 60 enzimas denominadas TRIM (do inglês – tripartite motif containing), por isso KAP-1 também pode ser denominado TRIM 28 (do inglês – tripartite motif containing 28) (43). É uma proteína co-repressora nuclear (44), podendo ser uma importante componente da sinalização de danos causados no DNA (45).

A proteína KAP-1 pode atuar de forma a interagir com diversos fatores ao inativar ou ativar outras grandes proteínas (51). Ele tem sido implicado em diversos processos

celulares, tais como o desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica, mas o seu mecanismo de ação ainda não está claro (51,52).

Os níveis da proteína KAP-1 são aumentados em pacientes com câncer de fígado, estômago, pulmão, mama, próstata e pacientes com câncer gástrico mostram uma taxa de sobrevivência significativamente menor quando expressam KAP-1 (52,53,54). A redução de KAP-1 em células de câncer gástrico causa prejuízo no crescimento celular, com um acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular, e a redução de KAP-1 nas células expostas à radiação aumenta os níveis de p53, sugerindo que KAP-1 pode promover a transformação neoplásica através da supressão da apoptose (55). Tais estudos levaram a proposta de que drogas anti-KAP-1 devem ser desenvolvidas para o uso em terapia anticâncer (56). No entanto não há nenhum relato de KAP-1 em câncer de tireoide.

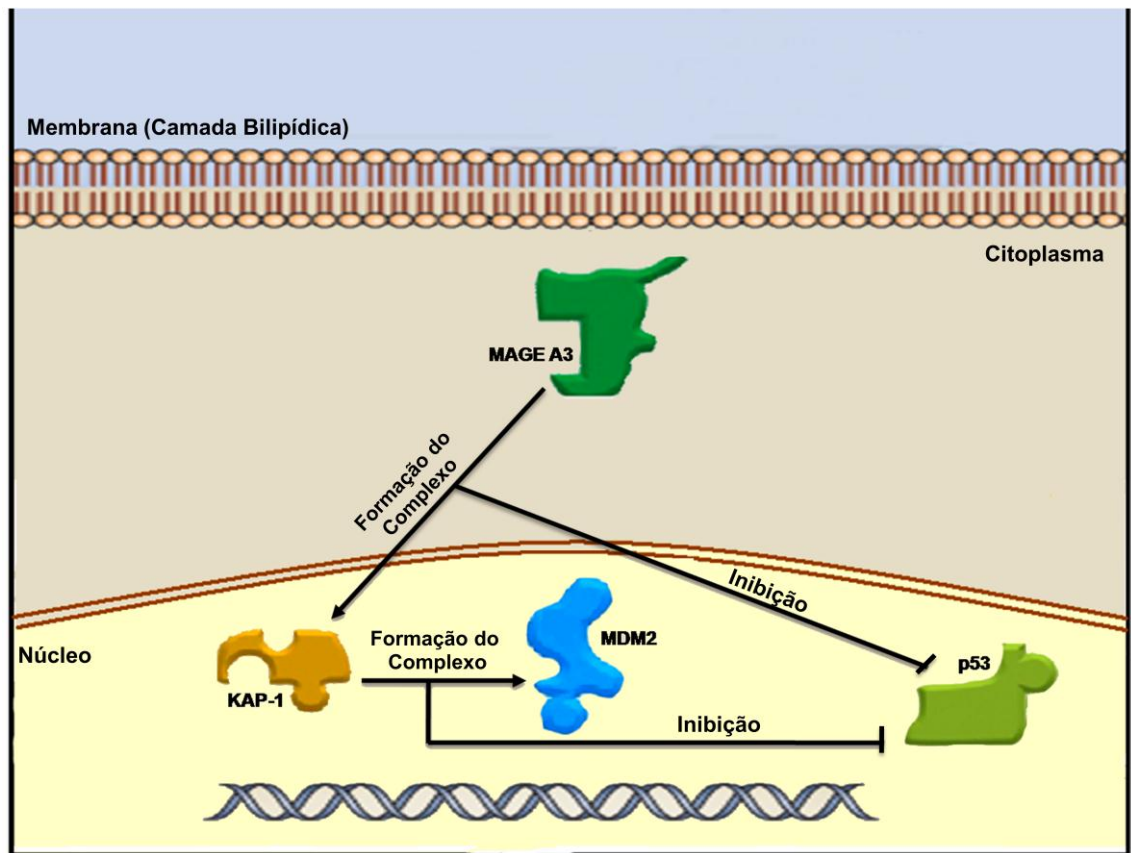
### **1.6 Relações de MAGE A3, KAP-1 e MDM2 com p53**

A superexpressão de KAP-1 coopera com a MDM2 para a inibição da acetilação de p53, estimulando a mudança de p53 e inibindo a transcrição e funções de apoptose. KAP-1 sozinho não interage com p53, mas pode ser orientada na direção deste ao interagir com MDM2 (55). A redução do nível endógeno de KAP-1 permite que p53 fique sensibilizando as células a apoptose após danos no DNA. Portanto, KAP-1 é uma proteína que vinculada a MDM2 contribui para a regulação de p53 funcional (58) (Figura 6).

Trabalhos investigando tumores da hipófise puderam constatar que o gene *MAGE-A3* é um importante candidato para a desregulação de p53 (58). Na relação entre MAGE e

p53 os três membros da família MAGE (A, B, C) formam complexos com a proteína KAP-1 atuando como um co-repressora da expressão e da função do p53 (44,55,58) (Figura 6).

Em conjunto com a indução da apoptose, o complexo KAP-1/MAGE diminui a p53, aumentando a imunoreatividade e a acetilação da p53, ativando assim a resposta deste gene (55). Desta maneira, a expressão das proteínas MAGE de classe tipo 1 pode suprimir a apoptose, inativando p53 e podendo contribuir para o desenvolvimento de malignidades, através do descontrole da apoptose, promovendo, assim, a sobrevivência do tumor (44).



**Figura 6.** Interação das proteínas MAGE A3, KAP-1 e MDM2 para a inativação de p53.

Ainda há muita controversa na literatura sobre um provável envolvimento de MAGE A3, P53, MDM2 e KAP-1 no Câncer de Tiroide. Se faz então interessante o estudo de MAGE A3 e suas proteínas correlatas para uma possível identificação de novos marcadores tumorais que possam colaborar na tomada de decisões clínicas e cirúrgicas.

## ***2. OBJETIVOS***

---

Como ainda há controvérsia na literatura sobre um provável envolvimento de MAGE A3, p53, MDM2 e KAP-1 em câncer de tireoide, nosso objetivo foi:

- ✓ Analisar a expressão proteica de MAGE A3, p53, MDM2 e KAP-1 através da técnica de imunohistoquímica em diferentes nódulos tireoidianos;
- ✓ Analisar a utilidade clínica dessas proteínas no diagnóstico e prognóstico de pacientes com CDT.

### ***3. MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### **3.1 Casuística**

Foram investigados 364 pacientes cujas amostras de tecido foram mantidas no Banco de Tecidos do Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, Brasil, (Tabela 1). Destes 364 pacientes, 190 são Carcinomas Papilíferos (CPT) (133 formas clássicas (CPCT), 53 variantes foliculares (CPVF) e 4 variantes de células altas (CPVCA) e 43 são Carcinomas Foliculares (CF) (23 minimamente invasivos e 20 francamente invasos). Obtivemos também 113 tecidos benignos de tiroide, incluindo: 57 Hiperplasias Colóides (H) e 56 Adenomas Foliculares (AF).

Além disso, obtivemos 18 casos de tecido normal da tiroide. Estes casos foram estudados através de 2 laminas (para cada proteína) de tissue microarray” (TMA, Beecher Instruments ®, Silver Springs, MD, EUA). Informações clínicas foram obtidas dos prontuários.



**Tabela 1.** Análise descritiva resumindo todos os pacientes estudados. Os dados estão expressos em número absoluto e classificados de acordo com o gênero: M-masculino; F-feminino e de acordo com a idade.

Diagnóstico	Histopatológico	Número de Pacientes	Gênero		Idade (anos)	
			M	F	<45	>45
Não Maligno	Tecido Normal	18	2	16	1	17
	Bócio Nodular	57	9	48	20	37
	Adenoma Folicular	56	7	49	27	29
	<b>Total</b>	<b>131</b>				
Maligno	<b>Carcinoma Papilífero</b>					
	<i>Tipo Clássico</i>	133	21	112	88	45
	<i>Variante Folicular</i>	53	18	35	23	30
	<i>Variante de Células Altas</i>	4	2	2	2	2
	<b>Carcinoma Folicular</b>	43	9	34	15	28
	<b>Total</b>	<b>233</b>				

**Abreviaturas:** M: sexo masculino; F: sexo feminino.

Os pacientes eram todos portadores de nódulos de tiroide submetidos a cirurgia de acordo com protocolo de rotina que incluía tireoidectomia total e exploração cervical e eventual dissecação de linfonodos cervicais conforme o consenso da American Thyroid Association e Latin American Thyroid Association (21, 22). Estes pacientes foram todos acompanhados também de acordo a tal protocolo padrão, com exames periódicos de ultrassonografia cervical, Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI), dosagem de Hormônio Estimulante da Tiroide (TSH) e tireoglobulina (Tg) séricos. Exames adicionais foram feitos

de acordo com indicações específicas e incluíam raios-X, ultrassonografia, tomografia computadorizada e outros procedimentos para detectar eventuais metástases à distância, por um período de 12 a 298 meses ( $53,8 \pm 41$  meses). Tumores recorrentes e/ou apresentando metástases à distância foram definidos de acordo com os parâmetros acima referidos.

Os pacientes com câncer de tireoide malignos foram classificados como livres de doença em 150 casos (85,22%) que apresentavam  $Tg < 2\text{ng/dl}$  e sem evidencia de imagem (metástase), e com recorrência em 26 casos (14,78%, incluindo 8 mortos pela doença) que possuíam  $Tg > 2\text{ng/dl}$  e/ou evidencia de imagem. Cinquenta e sete pacientes não puderam ser classificados com segurança em qualquer um desses dois grupos, e foram posteriormente excluídos de qualquer análise envolvendo prognóstico. Os níveis de Tg usados como corte para discriminar os dois grupos foi de  $Tg \geq 2\text{ng/dl}$  em função do acompanhamento médico deste pacientes na época em que estes valor ainda era usado como padrão em ensaios com sensibilidade funcional de  $1\text{ng/dL}$  (21, 22). Com a implementação de ensaio de sensibilidade funcional de  $0.2\text{ ng/dl}$ , consideramos a partir de 2011 indicação de recidiva valores de Tg acima de  $1\text{ng}$  e/ou em elevação. Agressividade ao diagnóstico foi determinada segundo o sistema Tumor Nódulo Metástase (pTNM) de classificação e o estadiamento de carcinoma diferenciado de tireoide.

### **3.2 Construção do microarranjo de tecidos tissuemicroarray (TMA)**

Tecidos de todos os 364 casos foram fixados em formalina, incluídos em parafina e revistos para confirmação diagnóstica, a fim de selecionar as áreas mais representativas

para construir um “tissue microarray” (TMA, Beecher Instruments ®, Silver Springs, MD, EUA) para a análise imunoistoquímica.

Utilizamos um aparelho de confecção de TMA, o *Manual Tissue Arrayer I* (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA), de propriedade do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, segundo protocolo rotineiramente utilizado pelo grupo de pesquisas do Hospital. As lâminas preparadas sofreram um banho de parafina e foram armazenadas em freezer a - 20 °C, até o momento do uso para reação de imunoistoquímica. Cada amostra foi colocada no TMA em triplicata após cuidadosa dissecação microscópica das áreas mais representativas da lesão.

### **3.3 Imunoistoquímica (IHQ)**

Os marcadores imunoistoquímico de células tumorais avaliados foram: MAGE A3, p53, MDM2 e KAP-1. Seções de cinco micrômetros foram colocadas em lâminas eletricamente carregadas, desparafinizadas e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos. Todos os cortes de tecido foram submetidas ao calor para recuperação antigênica com uso de tampão citrato 10% (10mM, pH 6,0) em um recipiente a vapor (90° C durante 30 minutos). Seções de tecidos foram incubadas durante a noite a 6° C com anticorpos (Tabela 2).

O sistema *Advanced* de detecção foi utilizado (DAKO, Carpenteria, CA, EUA). Foi aplicado DAB (3,3 - tetrahidrocloreto-diaminobenzidina; Sigma, St Louis, MA, EUA) como cromógeno por 5 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram contrastados

com hematoxilina. Os controles positivos e negativos foram executados no mesmo lote de reação.

**Tabela 2.** Especificações dos marcadores imunistoquímicos.

Marcador	Clone	Diluição	Empresa	Localização celular
MAGE A3	Policlonal de Coelho	1:10	Lifespan Biosciences	Citoplasma
P53	Monoclonal de Camundongo	1:100	Dako Cytomation	Núcleo
MDM2	Monoclonal de Camundongo	1:100	Abcam	Citoplasma
KAP-1	Policlonal de Coelho	1:250	Novus Biologicals	Núcleo

### 3.4 Avaliação Imunoistoquímica

A verificação da marcação destas proteínas nos tecidos tiroidianos foram analisadas de modo semi-quantitativo pelo Prof. Dr. José Vassallo e pela Profa. Dra. Elaine Cristina Morari no microscópio óptico de luz (Axiophot, Zeiss).

As células foram consideradas positivas para os marcadores imuno-histoquímicos quando uma coloração marrom era observada na típica localização celular. A porcentagem

de células positivas foi classificada como: 0 = nenhuma célula positiva, 1 = até 25% de células positivas, 2 = 25-50% de células positivas, 3 = 50-75% de células positivas, 4 = mais de 75% de células positivas. A intensidade foi classificada como: 0 = negativo, 1 = fraca coloração, 2 = moderada coloração, 3 = intensa coloração. A pontuação final foi calculada somando os dois, a porcentagem de células positivas e a intensidade da marcação, que variou entre 0-7. Para fins estatísticos, os casos classificados como de 0-2 foram agrupados e chamados de "negativos" e os casos que marcaram de 3-7 foram chamados de "positivos". As proteínas localizadas no citoplasma foram analisadas a positividade e a intensidade (somando) e para as proteínas localizadas no núcleo foram analisadas somente a positividade.

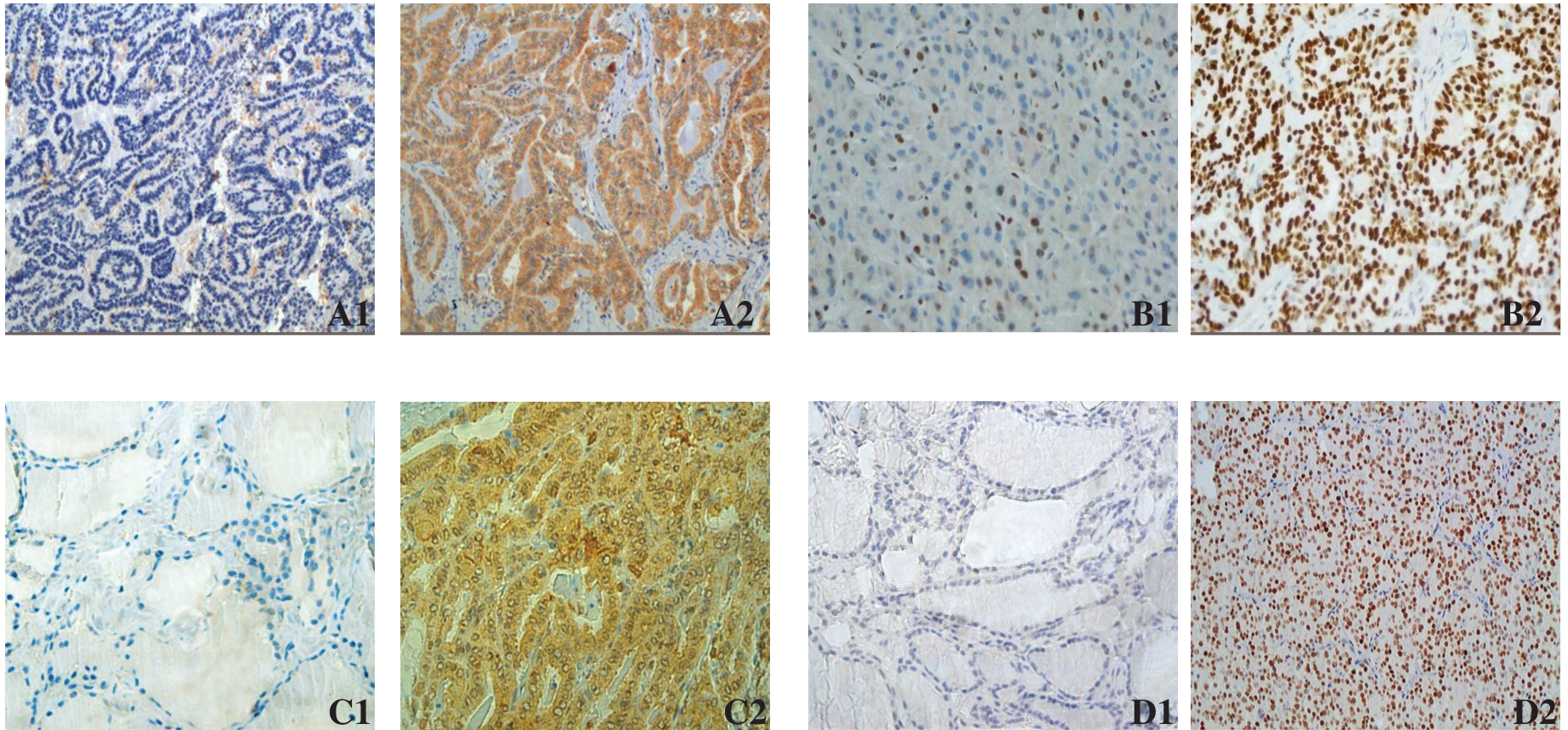
A expressão de MAGE A3 e MDM2 foram avaliadas para cada amostra de acordo com a porcentagem de células com coloração positiva. O principal critério para marcação com MAGE A3 e MDM2 como positivos foi a presença de imunorreatividade no citoplasma (Figura 7).

A expressão de KAP-1 e p53 também foram avaliadas para cada amostra de acordo com a porcentagem de células com coloração positiva, sendo o principal critério para marcação com KAP-1 e p53 a presença de imunorreatividade do núcleo (Figura 7).

Depois de confirmada a marcação positiva destas proteínas, a intensidade e a área da marcação dos casos das lâminas de TMA foram quantificados pelo equipamento ACIS (Dako) do Hospital AC Camargo, São Paulo.

Inicialmente as lâminas de TMA foram digitalizadas e as imagens fornecidas pelo software foram exibidas em um monitor. A partir dessas imagens a intensidade e a área da

marcação (positividade) foram analisadas em triplicata, foram consideradas três regiões diferentes de cada *spot*, os valores numéricos da intensidade e da área da marcação foram anotados, em seguida foi realizada a média desses valores para cada grupo de pacientes. Além disso, os valores da intensidade e da área da marcação foram submetidos à seguinte fórmula quando a proteína se encontrava expressa no citoplasma: intensidade multiplicada pela área marrom (área de expressão positiva da proteína) e dividida pelo somatório área azul (área de expressão negativa da proteína) mais a área marrom, essa fórmula foi realizada para as três análises de cada paciente e depois foi feita uma média final dos três valores para obter um valor único para cada caso.



**Figura 7:** Painel de tecidos que mostram células com expressão negativa e positiva para as proteínas estudadas. (A1) MAGE A3 negativo e (A2) MAGE A3 positivo (20x). (B1) KAP-1 negativo e (B2) KAP-1 positivo (40x). (C1) MDM2 negativo e (C2) MDM2 positivo (40x). (D1) P53 negativo e (D2) P53 positivo (40x).

### 3.5 Estadiamento dos tumores dos pacientes da lâmina de Tissue Microarray (TMA)

O estadiamento das neoplasias malignas da tireoide foi feito de acordo com a sétima edição do *International Union Against Cancer* (UICC), que se baseia na idade do paciente ao diagnóstico, no tipo histológico e no sistema TNM. Este sistema inclui 3 componentes: o tamanho do tumor primário (T), a presença ou ausência de metástase para linfonodo regional (N) e a presença ou ausência de metástase a distância (M) (tabela 3) (59). Todos os dados foram compilados em uma planilha para arquivo e análise estatística.

**Tabela 3.** Classificação do carcinoma da tireoide de acordo com a 7ª edição da UICC (*International Union Against Cancer*).

<b>Tumor</b>	
Tx	Sem definição do tamanho tumoral
T1	<2cm, restrito à tireoide
T1a	<1cm, restrito à tireoide
T1b	>1cm, restrito à tireoide
T2	> 2 e ≤ 4 cm, restrito à tireoide
T3	> 4 cm, restrito à tireoide ou mínima extensão extra-tiroideana
T4a	Tumor com extensão além da cápsula, invasão de tecido mole subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago ou nervo laringeo recorrente
T4b	Tumor invadindo fáscia pré-vertebral, vasos mediastínicos ou artéria carótida

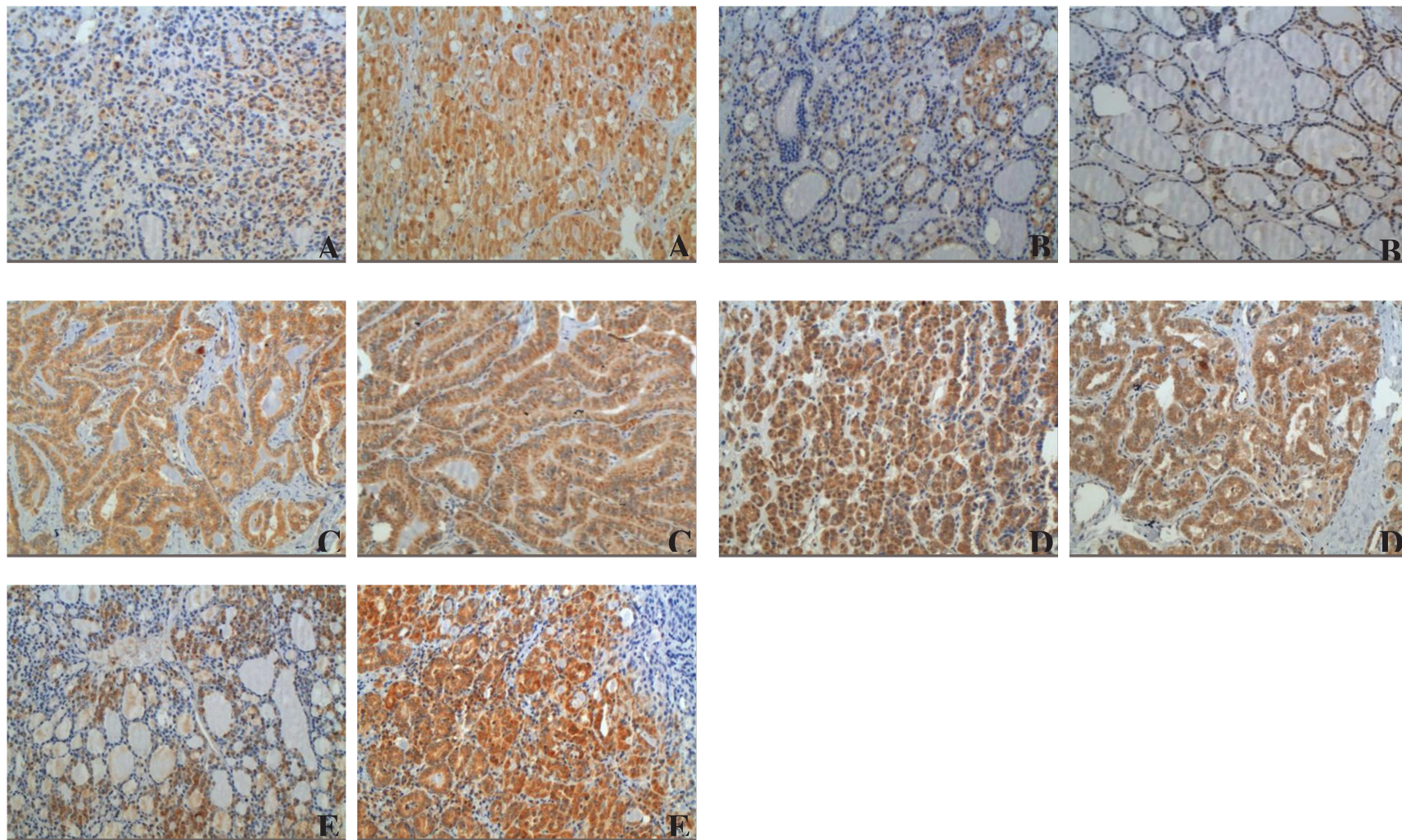


<b>Linfonodo</b>	
Nx	Sem definição de acometimento de linfonodos
N0	Sem metástase em linfonodos
N1	Metástase para linfonodo regional
N1a	Metástase nível VI (pré e para-traqueal, pré-laríngeo e de Delphian)
N1b	Metástases em outros cervicais unilaterais, bilaterais ou contralaterais ou mediastínicas
<b>Metástase</b>	
Mx	Sem definição de metástases à distância
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância
Estádio I	TxNxM0 < 45 anos; T1N0M0 ≥ 45 anos
Estádio II	TxNxM1 < 45 anos; T2N0M0 ≥ 45 anos
Estádio III	T3N0M0 > 45 anos; T1-3N1aM0 ≥ 45 anos
Estádio IV	IVA: T1-3N1bM0 > 45 anos; T4aN0-1 M0 ≥ 45 anos IVB: T4bNxM0 ≥ 45 anos IVC: TxNxM1 ≥ 45 anos

**Fonte:** Sobin *et al.*(59).

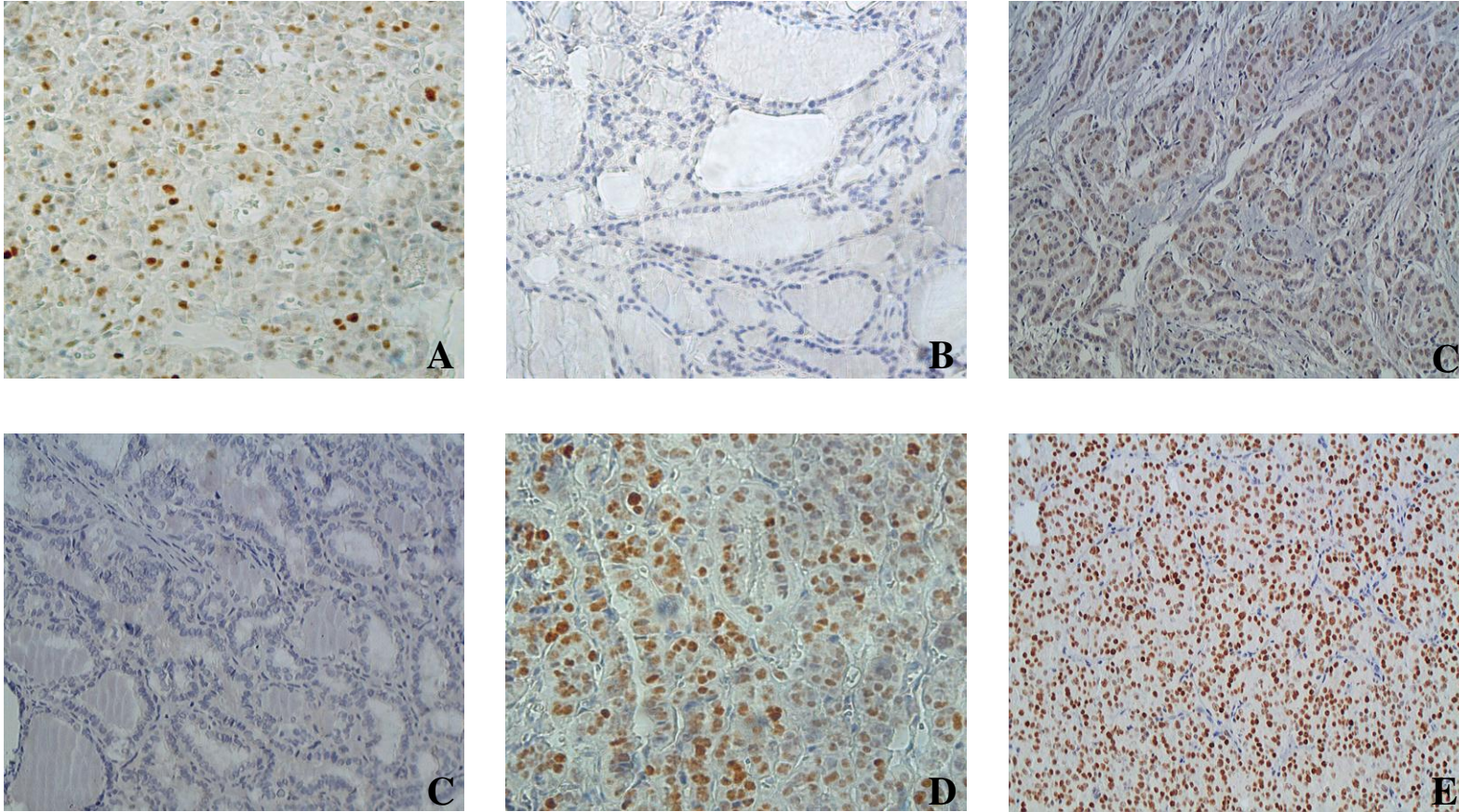
### **3.6 Análises da expressão proteica de MAGE A3, KAP-1, MDM2 e p53 através da técnica de imunohistoquímica**

A expressão proteica de MAGE A3 (figura 8), p53 (figura 9), MDM2 (figura 10), e de KAP-1 (figura 11) pode ser realizada em todos os tecidos tireoidianos estudados.



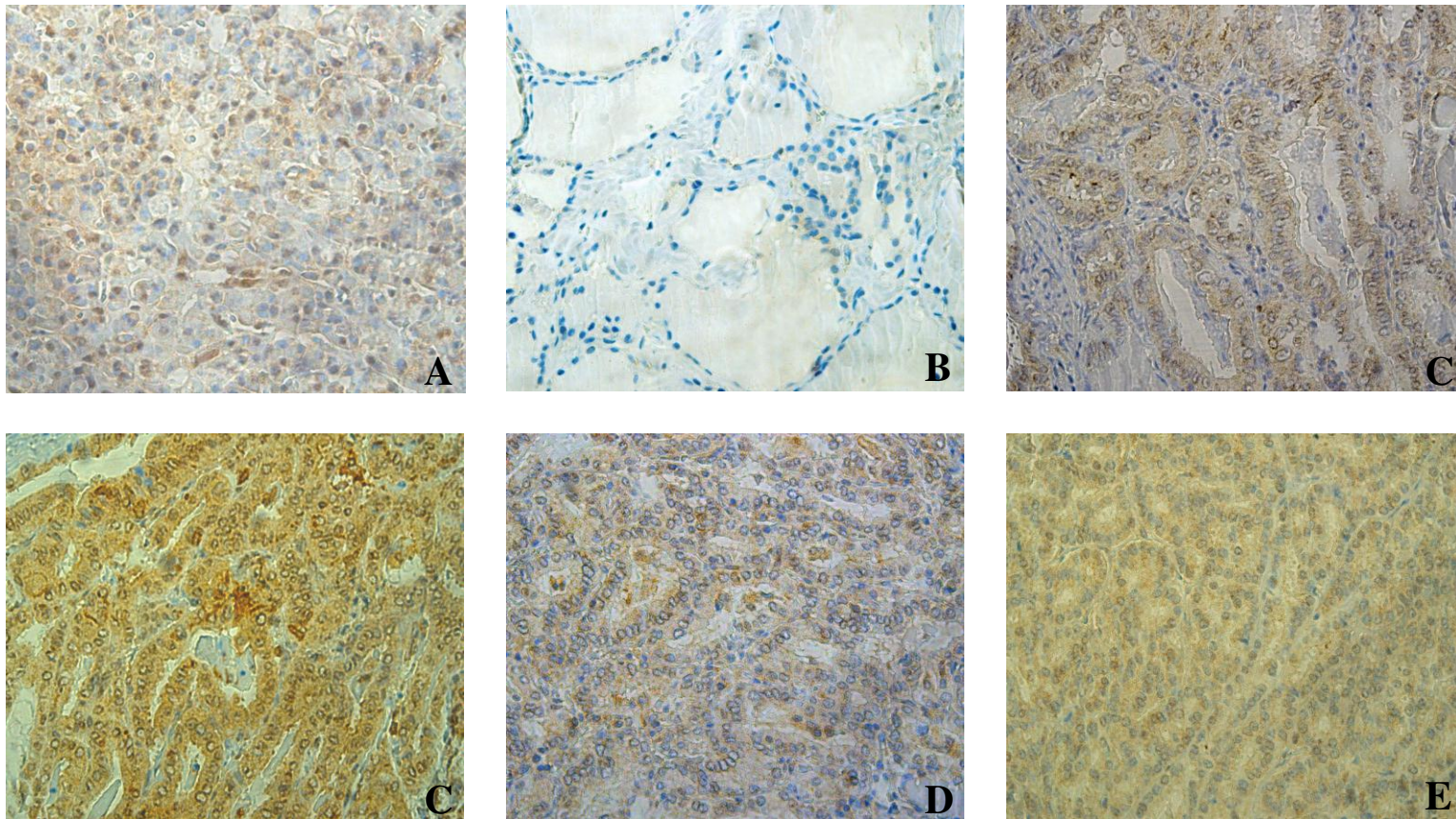
**Figura 8.** Expressão proteica de MAGE A3 em Adenoma Follicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Follicular (D) e Carcinoma Follicular (E) (Aumento de 20x).





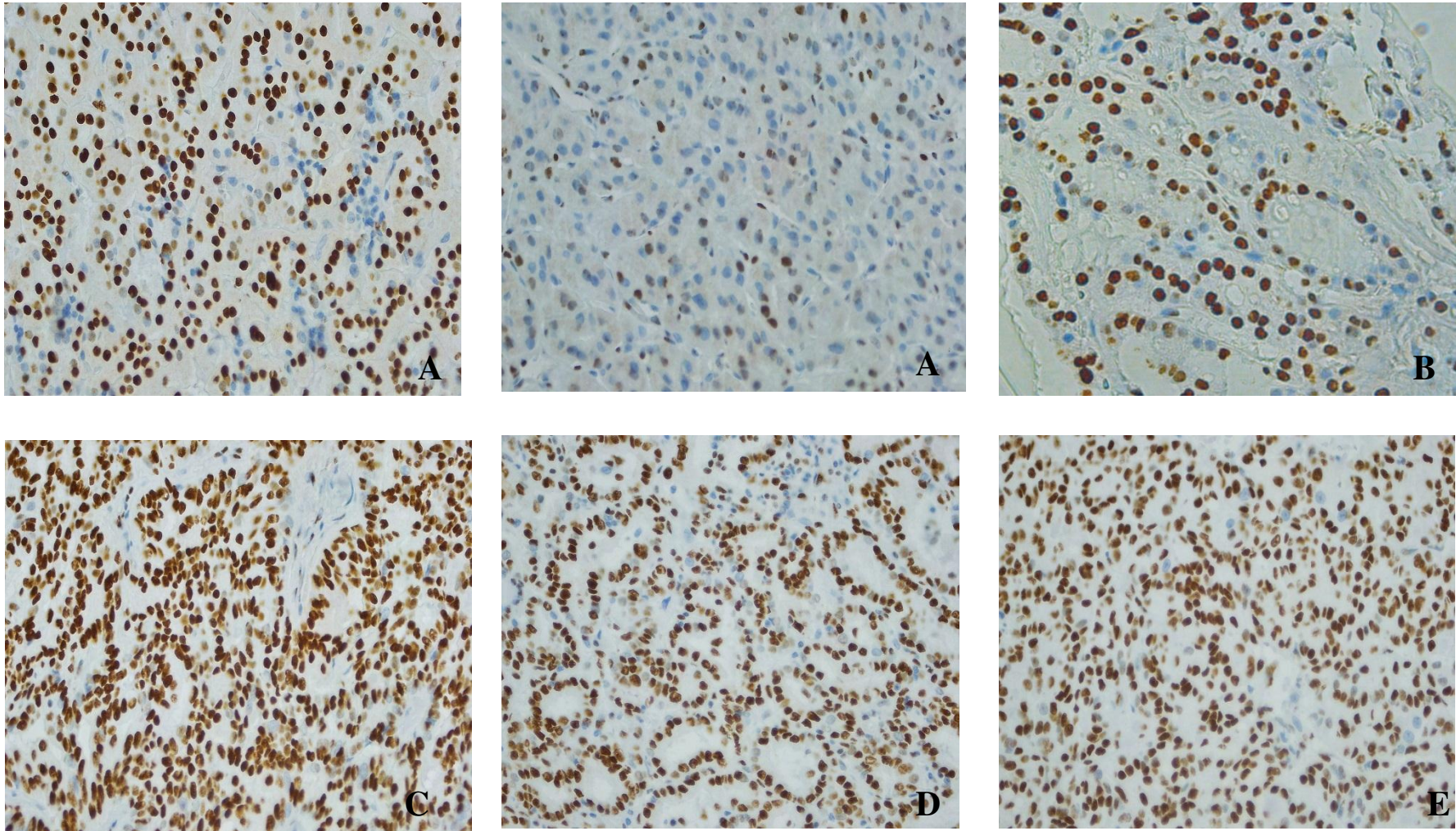
**Figura 9.** Expressão proteica de p53 em Adenoma Folicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Folicular (D) e Carcinoma Folicular (E) (Aumento de 40x).





**Figura 10.** Expressão proteica de MDM2 em Adenoma Folicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Folicular (D) e Carcinoma Folicular (E) (Aumento de 40x).





**Figura 11.** Expressão proteica de KAP-1 em Adenoma Folicular (A); Bócio (B); Carcinoma Papilífero (C); Carcinoma Papilífero de Variante Folicular (D) e Carcinoma Folicular (E) (Aumento de 40x).

### 3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do SAS System for Windows (Statistical Analysis System, versão 9.1.3, o Service Pack 3. Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, EUA). Sobrevida livre de doença foi calculada utilizando-se curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com análise de log-rank. Análises não paramétricas foram realizadas utilizando Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Um modelo de regressão logística multivariada foi aplicado usando o tipo de tumor (carcinoma papilífero ou folicular) como variável dependente e expressão de proteínas e fatores de risco clínico, incluindo sexo e idade como variáveis explanatórias. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar medidas contínuas entre dois grupos cuja variável não apresentava distribuição normal; Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar três ou mais grupos cujas variáveis não apresentaram distribuição normal. Teste T ou teste ANOVA foram utilizados para variáveis que apresentavam distribuição normal, comparando dois ou três ou mais grupos, respectivamente. Para verificar associação linear entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de Spearman. Já para o estabelecimento de valores de corte dos testes comparativos, foi utilizada uma curva ROC (receiver operating curve), que mostrou os pontos de sensibilidade/especificidade. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de  $p=0,05$ .

## ***4. RESULTADOS***

---

Como esperado, a maioria dos pacientes era do sexo feminino 81,31% (n = 296), e 18,69% dos pacientes eram do sexo masculino (n = 68). Entre os pacientes com nódulos benignos, a idade média no momento do diagnóstico foi de  $46,79 \pm 15,17$  (média  $\pm$  desvio padrão) anos, e entre aqueles com CDT, a idade média foi de  $45,78 \pm 15,40$  anos. De acordo com o sistema de estadiamento patológico TNM (pTNM) (59), 33 CDT (13,63%) estavam no estágio IV no momento do diagnóstico. Cinquenta e nove pacientes não possuíam informações suficientes ou estas eram duvidosas para a classificação pTNM. Estes pacientes foram excluídos de todas as comparações de dados estatísticos relativos ao estadiamento ou dados em que a classificação pTNM poderia interferir.

#### **4.1 Análise da utilidade clínica de MAGE A3 no diagnóstico e prognóstico destes pacientes.**

MAGE A3 foi analisada em: 314 pacientes: 154 CPT (sendo 101 CPCT, 49 CPVF e 4 CPVCA) e 41 CFT. 102 tecidos benignos de tiroide, incluindo: 51 Hiperplasias Nodulares e 51 AF e 17 casos de tecidos normais da tiroide.

A expressão de MAGE A3 foi mais frequente em pacientes com idade  $>45$  anos (Mann-Whitney,  $p=0,0170$ ) e foi mais frequente no sexo feminino (Mann-Whitney,  $p=0,0014$ ) comparada ao sexo masculino. Quanto à característica de etnia, não houve nenhuma correlação ( $p=0,9069$ ).

Quanto às características de agressividade como invasão, tamanho do tumor e multifocalidade, a positividade da proteína MAGE A3 foi maior (média= 143,21 e mediana= 91,625) nos casos em que havia invasão extratiroidiana (Mann-Whitney,



$p=0,0128$ ) do que nos casos sem invasão (média=71,765 e mediana= 69,060). No entanto não houve correlação com tamanho do tumor (Kruskal-Wallis,  $p=0,6526$ ) ou multifocalidade (Mann-Whitney,  $p=0,2576$ ).

Como esperado MAGE A3 estava mais expresso nos pacientes com o estadio II ao comparado com o estadio I- TMN (Wilcoxon,  $p=0,0107$ ). Sua expressão não se relacionou com o tempo livre de doença (Mann-Whitney,  $p=0,3986$ ).

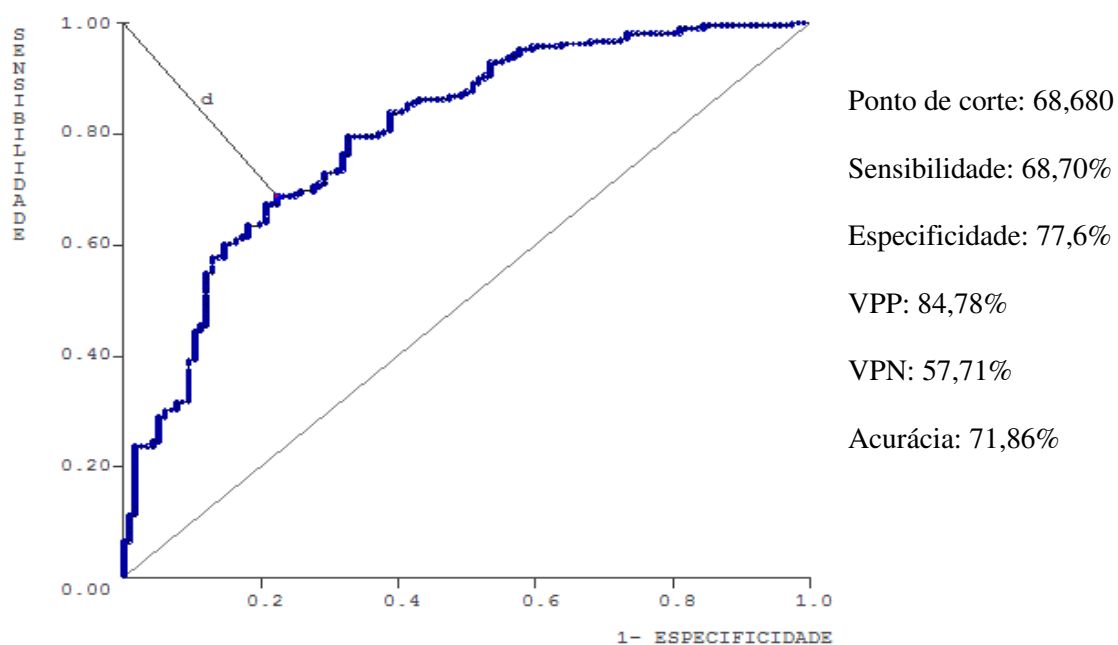
Analisando a expressão proteica de MAGE A3 através da imunoistoquímica semi-quantitativa (visual) em tecidos tireoidianos, pudemos observar que a proteína foi mais frequente em tecidos tireoidianos malignos do que em tecidos benignos ( $p<0,001$ ) (Tabela 4). Também foi possível observar que MAGE A3 diferenciou algumas lesões de padrão folicular (Tabela 4).

**Tabela 4.** Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa e de MAGE A3.

Grupos Analisados	Valor de <i>p</i> (IHQ semi-quantitativa)	IHQ semi-quantitativa		Valores Preditivos	
		%		%	
		Sensibilidade	Especificidade	Positivo	Negativo
Maligno <i>versus</i> Benigno	<0,0001	94,87	32,35	72,83	76,74
CPCT <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	96,04	49,06	78,86	86,21
CPCT <i>versus</i> AF	0,0215	96,04	15,96	69,29	66,67
CPCT <i>versus</i> Variantes	NS	NS	NS	NS	NS
CPVF <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	89,80	49,02	62,86	83,33
CPVF <i>versus</i> AF	NS	NS	NS	NS	NS
CPVF <i>versus</i> CFT	NS	NS	NS	NS	NS
CF <i>versus</i> AF	0,0396	97,56	15,69	48,19	88,89
CFT <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	97,56	49,02	60,61	96,15
AF <i>versus</i> Hiperplasia	0,0006	84,31	49,02	62,32	75,76

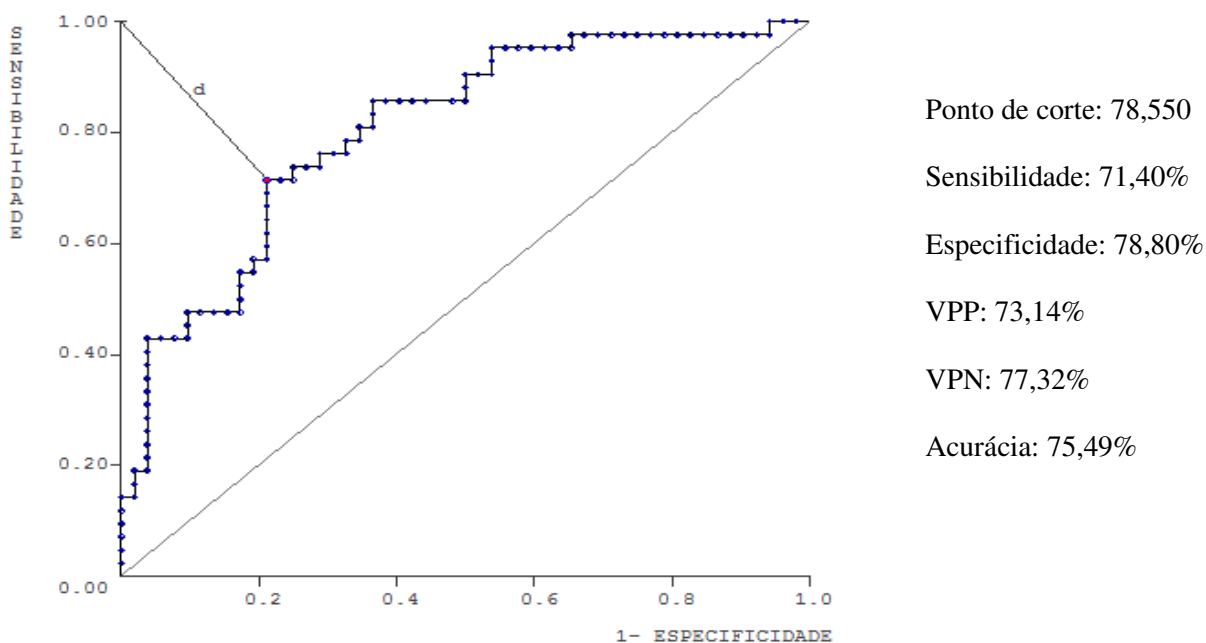
Legendas: CPCT= forma clássica do CPT; CPVF= variante folicular do CPT; CFT= carcinoma folicular; FA= adenoma folicular; Variantes= CPVF + CPCA= variante de células altas; NS= não significativo.

A partir das médias das quantificações emitidas pelo equipamento Acis, foi possível realizar uma curva Roc para diagnósticos em câncer de tireoide. Sendo assim a curva ROC (Figura 12) pode apresentar um ponto razoável de especificidade e sensibilidade, sendo que para um valor de 68,680 como ponto de corte (grupo câncer maior ou igual a 68,680 e benignos menor que esse valor), encontramos uma sensibilidade de 68,70%, especificidade de 77,6%, Valor Preditivo Positivo de 84,78% e Valor Preditivo Negativo de 57,71% e Acurácia de 71,86% para malignidade através da expressão de MAGE A3.

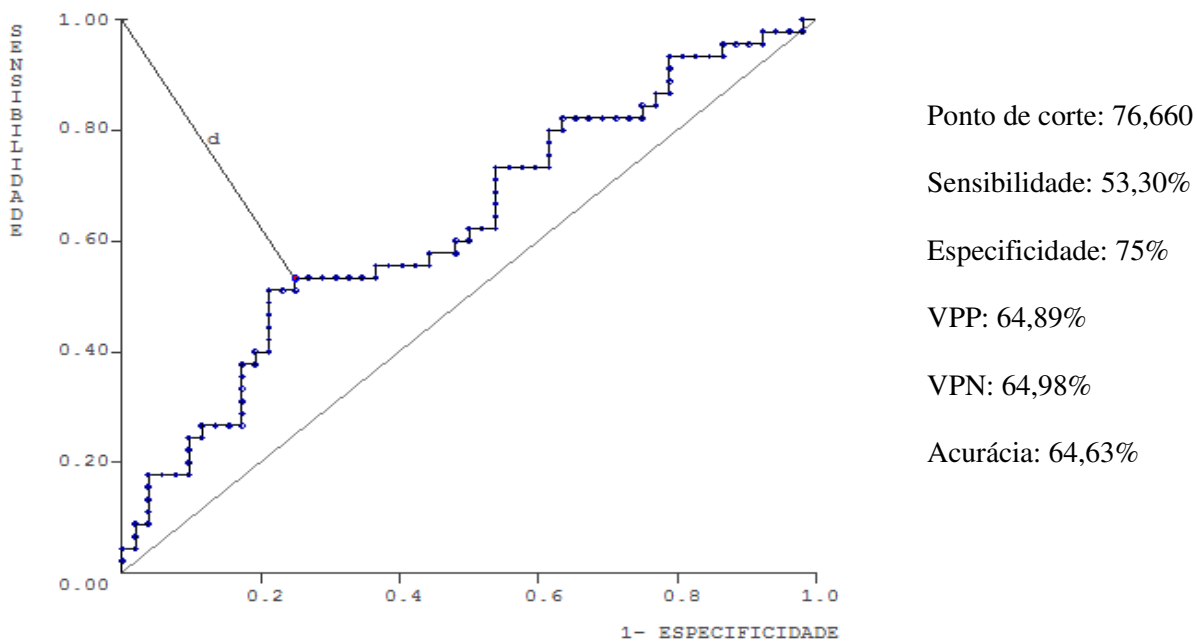


**Figura 12.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MAGE A3 em tecidos malignos *versus* benignos.

O mesmo foi realizado com as lesões que representam os principais problemas de diagnósticos das lesões foliculares: CFT, AF, CPVF. A comparação de CFT *versus* AF (Figura 13) apresentou um ponto alto de especificidade e sensibilidade, sendo que para o valor 78,550 como ponto de corte (grupo CFT maior ou igual a 78,550 e AF menor que isso), encontramos uma sensibilidade de 71,40%, especificidade de 78,80%, Valor Preditivo Positivo de 73,14% e Valor Preditivo Negativo de 77,32% e Acurácia de 75,49%. Mas na comparação de CPVF *versus* AF (Figura 14), não houve nenhum ponto de alta especificidade e sensibilidade, sendo que para o valor de 76,660 como ponto de corte (grupo CPVF maior ou igual a 76,660 e AF menor que isso), encontramos uma sensibilidade de 53,30%, especificidade de 75%, Valor Preditivo Positivo de 64,86% e Valor Preditivo Negativo de 64,98% e Acurácia de 64,93%.



**Figura 13.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MAGE A3 em CFT *versus* AF.



**Figura 14.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MAGE A3 em CPVF *versus* AF.

#### **4.2 Análise da utilidade clínica de P53 no diagnóstico e prognóstico de pacientes com CDT.**

P53 foi analisada em 357 pacientes: 190 CPT (sendo 133 CPCT, 53 CPVF e 4 CPVCA) e 42 CFT. Também avaliamos 109 tecidos benignos de tireoide, incluindo: 54 Hiperplasias Nodulares e 55 AF e 16 casos de tecidos normais da tireoide.

Ao analisar as características do paciente, como idade, sexo e etnia através das análises quantitativas da imunistoquímica pelo equipamento Acis, podemos observar que P53 não se correlacionou com idade (Mann-Whitney,  $p=0,1086$ ) e etnia (Test T,  $p=0,4266$ ).

No entanto a expressão proteica de P53 se mostrou mais frequente no sexo feminino com média= 41,340 e mediana= 29,400 compara da ao sexo masculino (media= 26,158 e mediana= 17,465; Mann-Whitney,  $p=0,0221$ ).

Quanto às características de agressividade como invasão, tamanho do tumor e multifocalidade, a positividade da proteína P53 não se correlacionou com invasão extratiroidiana (Mann-Whitney,  $p=0,2691$ ) nem com multifocalidade (Mann-Whitney,  $p=0,0638$ ). No entanto houve correlação com tamanho do tumor (Anova,  $p<0,0001$ ) diferenciando os grupos de tumores <2cm *versus* 2-4cm ( $p<0,05$ ) pois P53 foi mais expressa nos tumores menores que 2cm.

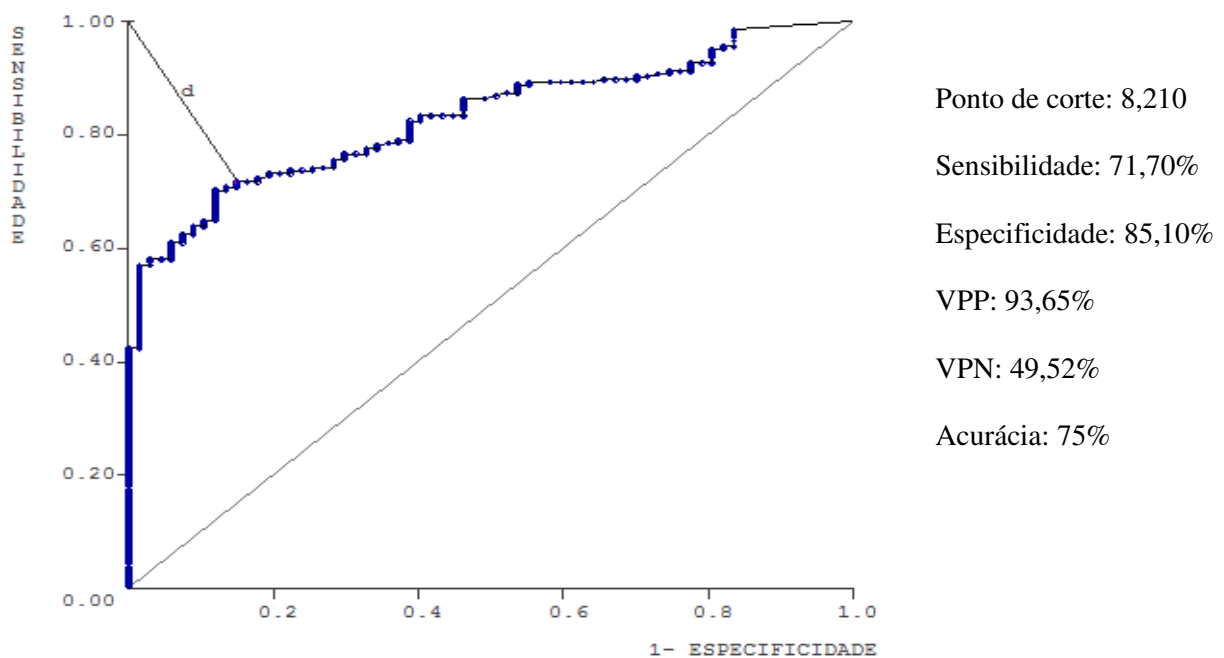
Não houve correlação da P53 com o estágio dos pacientes - TMN (Kruskal-Wallis,  $p=0,3153$ ). Analisando a expressão proteica de P53 através da imunistoquímica semi-quantitativa (visual) em tecidos tiroidianos, podemos observar que a proteína foi mais expressa em tecidos tireoidianos malignos do que em tecidos benignos ( $p<0,001$ ) (Tabela 5). Também foi possível observar que P53 diferenciou algumas lesões de padrão folicular entre si (Tabela 5).

**Tabela 5.** Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa de P53.

Grupos Analisados	Valor de <i>p</i> (IHQ semi-quantitativa)	IHQ semi-quantitativa		Valores Preditivos	
		%		%	
		Sensibilidade	Especificidade	Positivo	Negativo
Maligno <i>versus</i> Benigno	<0,0001	58,19	79,82	85,99	47,28
CPCT <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	63,16	92,59	95,45	50,51
CPCT <i>versus</i> AF	0,0002	63,16	67,27	82,35	43,02
CPCT <i>versus</i> Variantes	NS	NS	NS	NS	NS
CPVF <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	64,15	95,59	89,47	72,46
CPVF <i>versus</i> AF	0,0019	64,15	67,27	65,38	66,07
CPVF <i>versus</i> CFT	0,0038	33,33	35,85	29,17	40,43
CFT <i>versus</i> AF	NS	NS	NS	NS	NS
CFT <i>versus</i> Hiperplasia	0,0016	33,33	92,59	77,78	64,10
AF <i>versus</i> Hiperplasia	0,0015	32,73	92,59	81,82	57,47

Legendas: CPCT= forma clássica do CPT; CPVF= variante folicular do CPT; CFT= carcinoma folicular; FA= adenoma folicular; Variantes= CPVF + CPCA= variante de células altas; NS= não significativo.

A curva ROC (Figura 15) apresentou um ponto alto de especificidade e sensibilidade através das médias, sendo que para o valor da média 8,210 como ponto de corte (grupo câncer maior ou igual a 8,210 e benignos menor que isso), encontramos uma sensibilidade de 71,70%, especificidade de 85,10%, Valor Preditivo Positivo de 93,65% e Valor Preditivo Negativo de 49,52% e Acurácia de 75%.

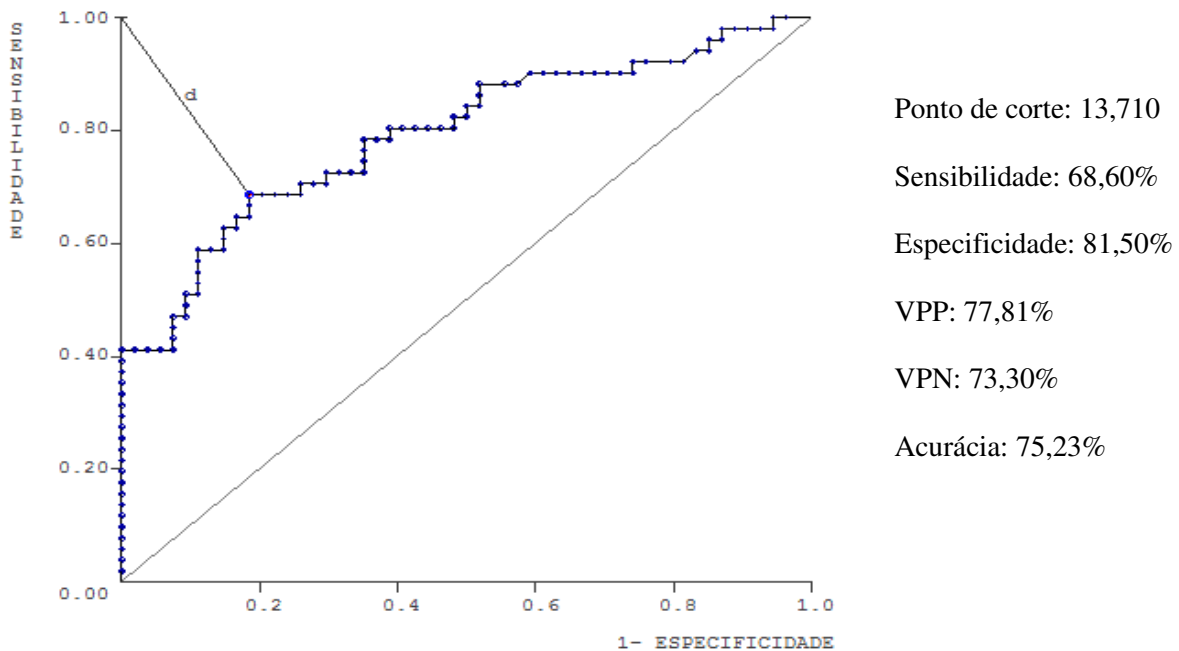


**Figura 15.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em tecidos malignos *versus* benignos.

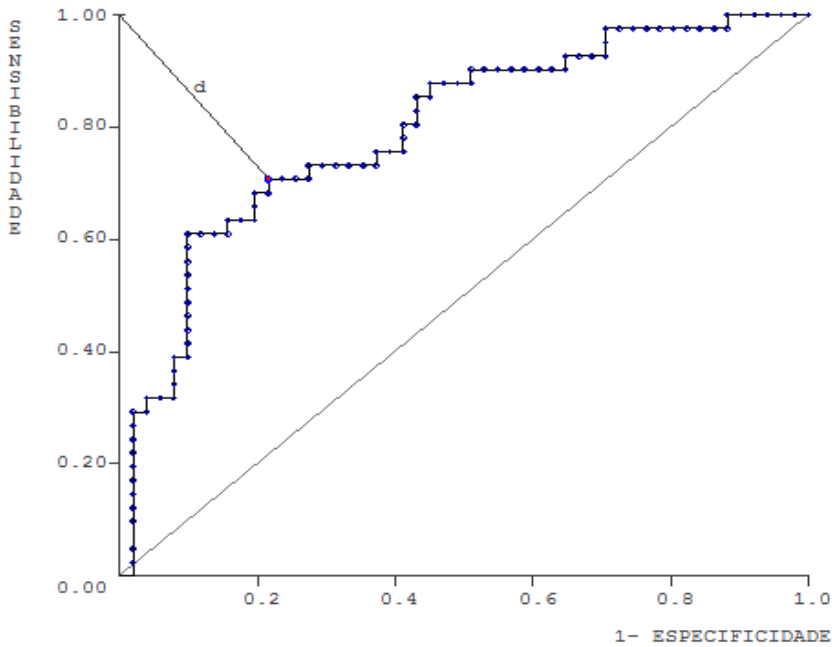
A comparação de P53 em lesões foliculares mostrou que P53 diferencia CPVF de AF (Figura 16), para o valor de 13,710 (melhor ponto na ROC) com sensibilidade de 68,60%, especificidade de 81,50%, Valor Preditivo Positivo de 77,81% e Valor Preditivo Negativo de 73,30% e Acurácia de 75,23%. A comparação de CPVF *versus* CFT (Figura



17) para o valor da média 16,740 como ponto de corte (grupo CPVF maior ou igual a 16,740 e CFT menor que isso) diferencia ambas as lesões com uma sensibilidade de 70,70%, especificidade de 78,4%, Valor Preditivo Positivo de 72,49% e Valor Preditivo Negativo de 76,87% e Acurácia de 74,97%. A diferenciação de CPVF *versus* H (Figura 18) para o valor da média 8,220 como ponto de corte (grupo CPVF maior ou igual a 8,220 e H menor que isso) mostrou uma sensibilidade de 78,40%, especificidade de 82%, Valor Preditivo Positivo de 81,63% e Valor Preditivo Negativo de 78,82% e Acurácia de 80,18%.

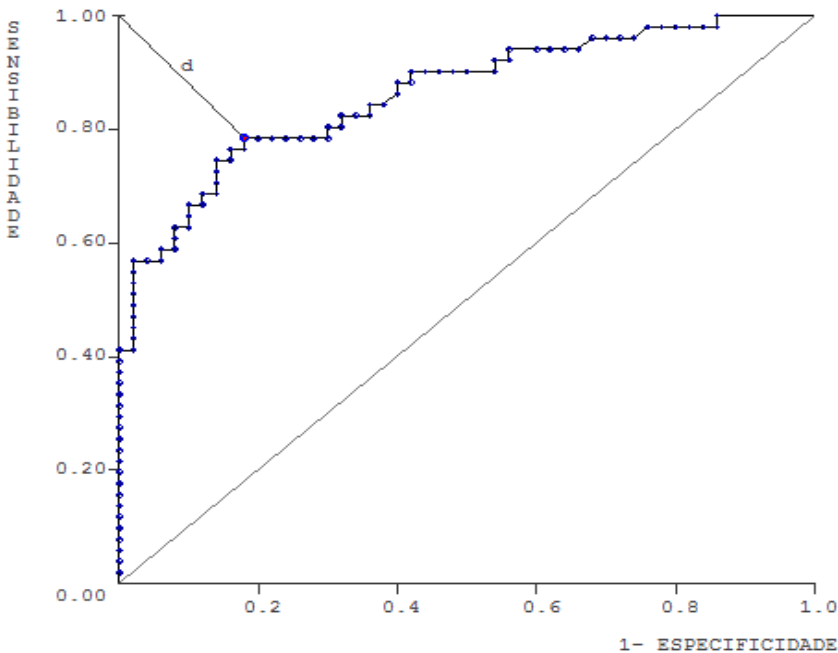


**Figura 16.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em CPVF *versus* AF.



Ponto de corte: 16.740  
 Sensibilidade: 70%  
 Especificidade: 78%  
 VPP: 72,49%  
 VPN: 76,87%  
 Acurácia: 74,97%

**Figura 17.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em CPVF *versus* CFT.



Ponto de corte: 8,220  
 Sensibilidade: 78,40%  
 Especificidade: 82%  
 VPP: 81,63%  
 VPN: 78,82%  
 Acurácia: 80,18%

**Figura 18.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de P53 em CPVF *versus* H.

### **4.3 Análise da utilidade clínica de MDM2 no diagnóstico e prognóstico destes pacientes.**

MDM2 foi analisada em 334 pacientes: 173 eram CPT (sendo 122 CPCT, 47 CPVF e 4 CPVCA) e 41 eram CFT. Os 103 tecidos benignos de tireoide incluíram 53 Hiperplasias Nodulares e 50 AF, além de 17 casos de tecidos normais da tireoide.

Ao analisar as características do paciente, como idade, sexo e etnia pelas análises quantitativas da imunohistoquímica do equipamento Acis, podemos observar que MDM2 se correlacionou com idade <45 anos (Test T,  $p=0,0024$ ). A expressão proteica de MDM2 se mostrou mais frequente no sexo feminino (Test T,  $p=0,0017$ ) com média= 59,759 e mediana= 60,330, comparada ao sexo masculino (média= 42,705 e mediana= 40,850). A etnia não se correlacionou com MDM2 (Test T,  $p=0,3969$ ).

Quanto às características de agressividade como invasão, tamanho do tumor e multifocalidade, a positividade da proteína MDM2 não se mostrou útil na identificação de invasão extratiroideiana (Test T,  $p=0,6561$ ) e de multifocalidade (Test T,  $p=0,1930$ ). No entanto houve correlação com tamanho do tumor (Anova,  $p=0,0031$ ) diferenciando os grupos <2cm (média= 4,856) daqueles tumores entre 2-4cm (média= 63,484;  $p>0,05$ ).

Não foi possível correlacionar MDM2 com o estágio dos pacientes - TMN (Anova,  $p=0,3311$ ), nem com o prognóstico destes pacientes (Test T,  $p=0,4891$ ). Analisando a expressão proteica de MDM2 através da imunohistoquímica semi-quantitativa (visual) em tecidos tireoidianos, pudemos observar que a proteína foi mais frequente em tecidos tireoidianos malignos do que em tecidos benignos ( $p<0,001$ ) (Tabela 6).

Também foi possível observar que MDM2 diferenciou algumas lesões de padrão folicular (Tabela 6).

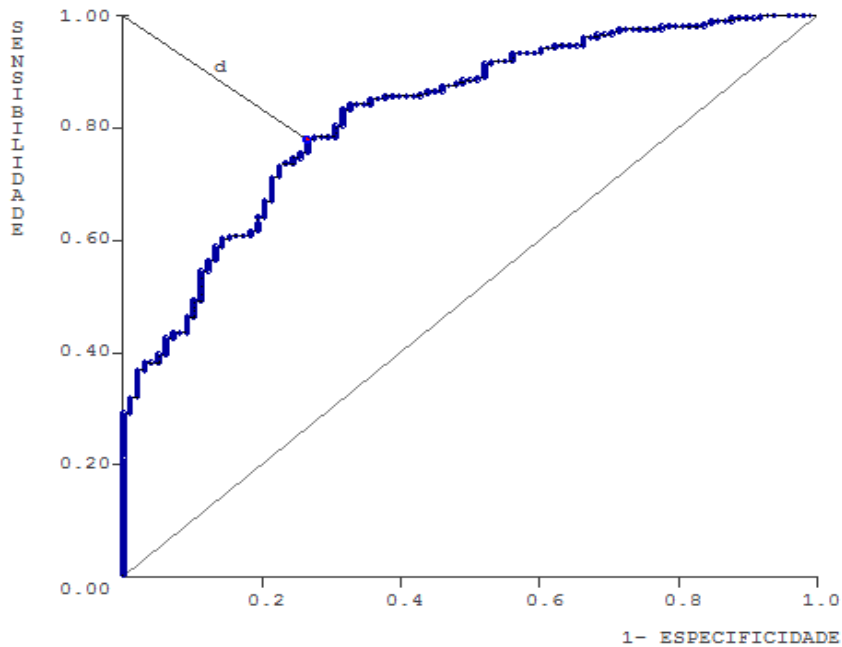
A curva ROC (Figura 19) diferenciou, a partir do valor de 31,450 (grupo câncer maior ou igual a 31,450 e benignos menor que isso) tecidos malignos de benignos com sensibilidade de 78%, especificidade de 73,50%, Valor Preditivo Positivo de 86,27% e Valor Preditivo Negativo de 61,01% e Acurácia de 76,56%.

O mesmo foi realizado com os principais problemas de diagnósticos com lesões foliculares. Na comparação de CFT *versus* AF (Figura 20), para o valor de 23,010 como ponto de corte (grupo CF maior ou igual a 13,170 e AF menor que isso), encontramos uma sensibilidade de 54,10%, especificidade de 42,90%, Valor Preditivo Positivo de 45,46% e Valor Preditivo Negativo de 51,51% e Acurácia de 48,14%. A comparação de CPVF *versus* AF (Figura 21) usando o valor de 38,220 como ponto de corte (grupo CPVF maior ou igual a 38,220 e AF menor que isso) mostrou uma sensibilidade de 64,30%, especificidade de 63,40%, Valor Preditivo Positivo de 64,28% e Valor Preditivo Negativo de 63,42% e Acurácia de 63,86%.

**Tabela 6.** Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa de MDM2.

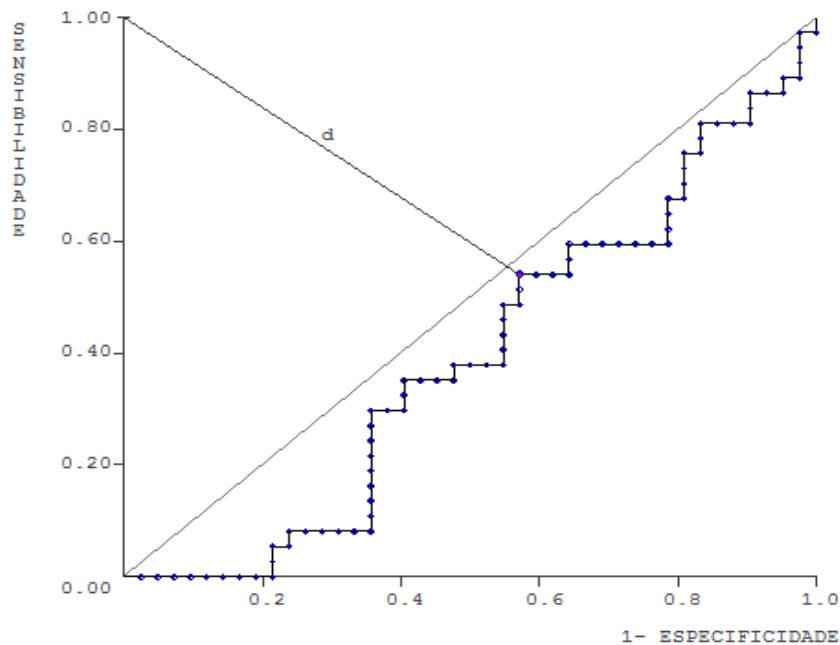
Grupos Analisados	Valor de <i>p</i> (IHQ semi-quantitativa)	IHQ semi-quantitativa	Valores Preditivos		
		%	%		
		Sensibilidade	Especificidade	Positivo	Negativo
Maligno <i>versus</i> Benigno	<0,0001	71,50	72,82	84,53	55,15
CPCT <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	86,89	84,91	92,98	73,77
CPCT <i>versus</i> AF	<0,0001	86,89	60	84,13	65,22
CPCT <i>versus</i> Variantes	0,0007	59,57	84,91	77,78	70,31
CPVF <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	59,57	84,91	77,78	70,31
CPVF <i>versus</i> AF	NS	NS	NS	NS	NS
CPVF <i>versus</i> CFT	0,0354	36,59	40,43	34,88	42,22
CFT <i>versus</i> AF	NS	NS	NS	NS	NS
CFT <i>versus</i> Hiperplasia	0,0281	36,59	84,91	65,22	63,38
AF <i>versus</i> Hiperplasia	0,0073	40	84,91	71,43	60

Legendas: CPCT= forma classica do CPT; CPVF= variante folicular do CPT; CFT= carcinoma folicular; FA= adenoma folicular; Variantes= CPVF + CPCA= variante de células altas; NS= não significativo.



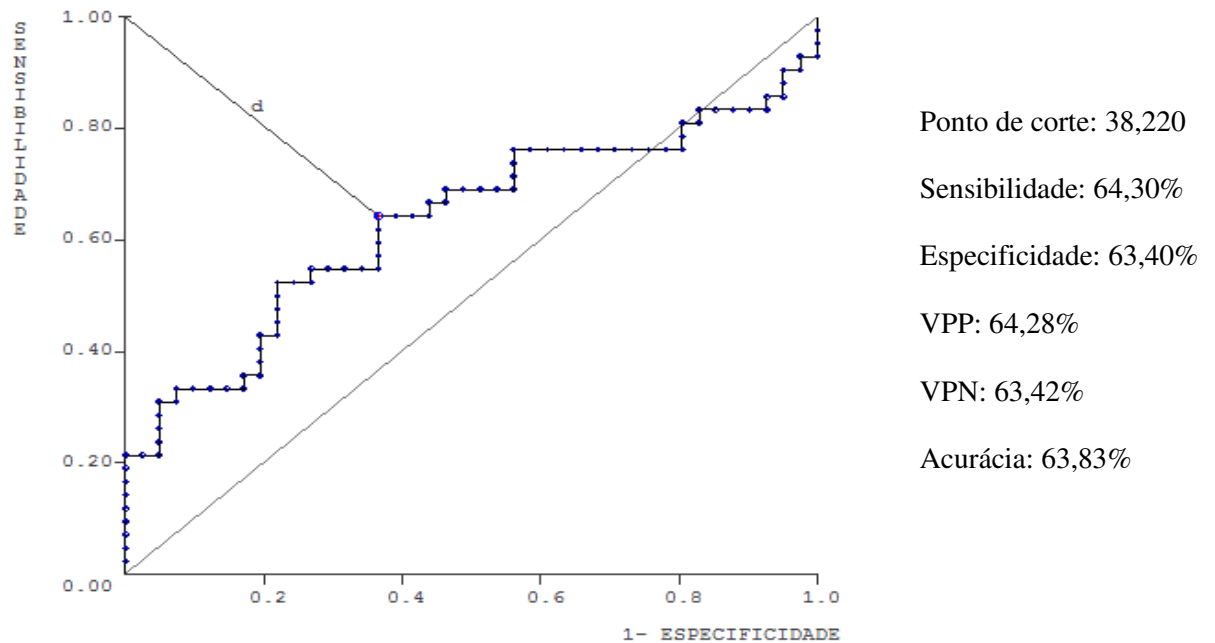
Ponto de corte: 31,450  
 Sensibilidade: 78%  
 Especificidade: 73,50%  
 VPP: 86,27%  
 VPN: 61,01%  
 Acurácia: 76,56%

**Figura 19.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MDM2 em tecidos malignos *versus* benignos.



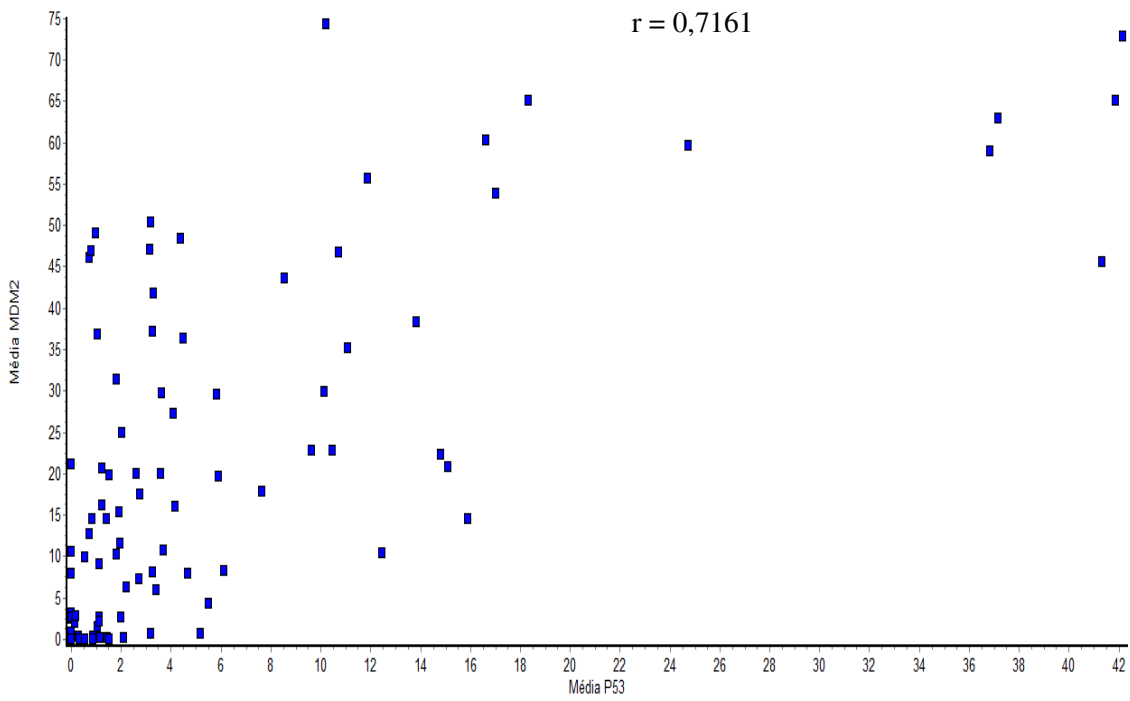
Ponto de corte: 23,010  
 Sensibilidade: 54,10%  
 Especificidade: 42,90%  
 VPP: 45,46%  
 VPN: 51,51%  
 Acurácia: 48,14%

**Figura 20.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MDM2 em CF *versus* AF.

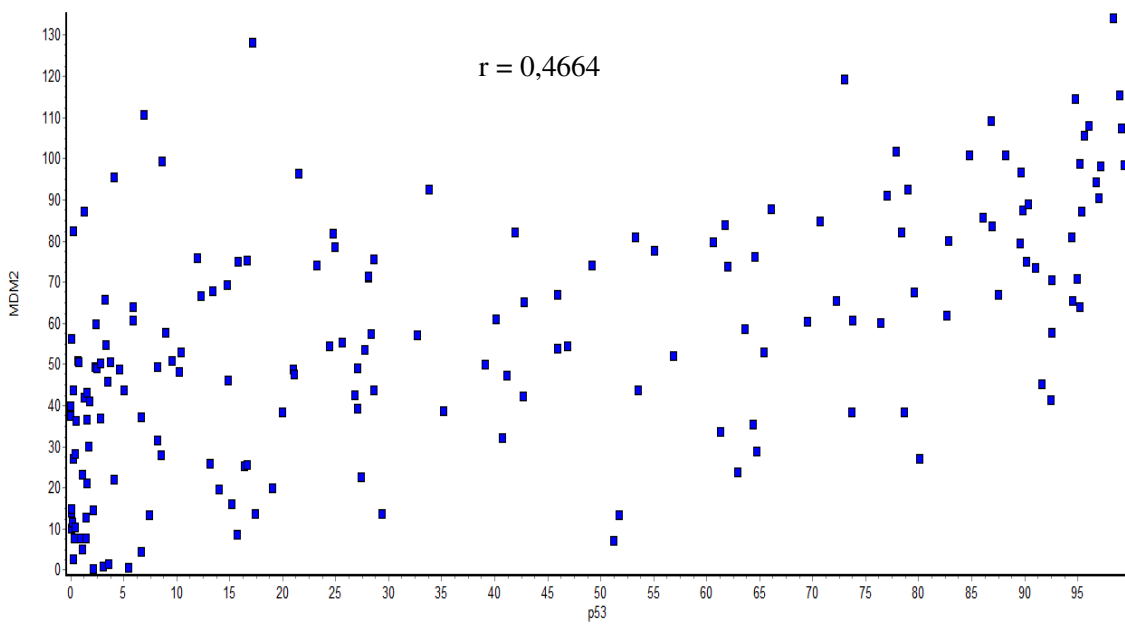


**Figura 21.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de MDM2 em CPVF *versus* AF.

O Teste de correlação Spearman mostrou que a expressão quantitativa de P53 e de MMD2 estavam correlacionadas tanto nos tecidos benignos ( $p < 0,0001$  - Figura 22) quanto nos tecidos malignos ( $p < 0,0001$  - Figura 23), mostrando que onde há pouca expressão de P53 também há pouca expressão de MDM2 e o inverso também pode ser notado.



**Figura 22.** Correlação de P53 e MDM2, nos tecidos tiroidianos benignos.



**Figura 23.** Correlação de P53 e MDM2, nos tecidos tiroidianos malignos.



#### **4.4 Análise da utilidade clínica de KAP-1 no diagnóstico e prognóstico destes pacientes.**

KAP-1 foi analisada em 361 pacientes: 187 eram CPT (sendo 130 CPCT, 53 CPVF e 4 CPVCA) e 43 com CFT; 113 tecidos benignos de tireoide, incluindo: 56 Hiperplasias Nodulares e 57 AF; e 18 casos de tecidos normais da tireoide.

Ao analisar as características do paciente e as análises quantitativas da imunoistoquímica pelo equipamento Acis, podemos observar que KAP-1 não se correlacionou com idade (Mann-Whitney,  $p=0,1947$ ), nem com sexo (Mann-Whitney,  $p=0,1810$ ), e tampouco com etnia (Test T,  $p=0,2054$ ).

Quanto às características de agressividade do tumor, a positividade da proteína KAP-1 não se correlacionou com invasão extratiroideana (Mann-Whitney,  $p=0,7417$ ) ou com multifocalidade (Mann-Whitney,  $p=0,4478$ ). No entanto, KAP-1 foi mais expresso em tumores maiores (Anova,  $p=0,0038$ ), diferenciando os grupos <2cm (mediana= 77,640) dos tumores de 2-4cm (mediana= 80,335;  $p>0,05$ ); <2cm *versus* >4cm (mediana= 90,740;  $p<0,01$ ) com e 2-4cm *versus* >4cm ( $p>0,05$ ).

Não foi possível correlacionar KAP-1 com o estágio dos pacientes - TMN (Kruskal-Wallis,  $p=0,1482$ ), no entanto a proteína se correlacionou com evolução estando mais expressa em pacientes com recorrência (Mann-Whitney,  $p=0,0130$ ) com média= 85,748 e mediana= 90,810. Infelizmente, a sobrevida livre de doença calculada pelas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com análise de log-rank, não foi significativa ( $p=0,4343$ ).

Analisando a expressão proteica de KAP-1 através da imunistoquímica semi-quantitativa em tecidos tireoidianos, podemos observar que a proteína foi mais frequente em tecidos tireoidianos malignos do que em tecidos benignos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 7).

Também foi possível observar que KAP-1 diferenciou algumas lesões de padrão folicular, como mostra a tabela 7.

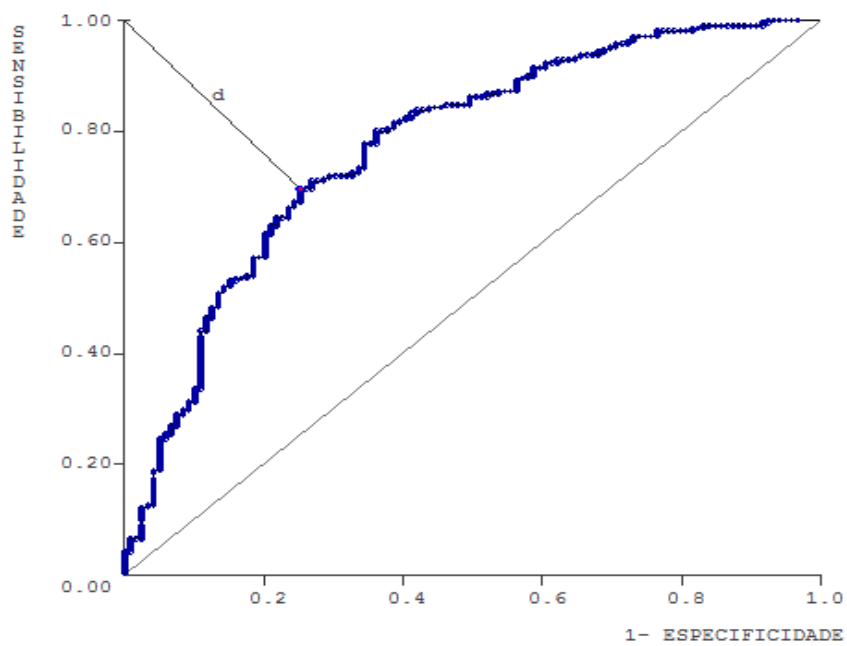
A curva ROC (Figura 24) para o valor de 73,190 como ponto de corte (grupo câncer maior ou igual a 73,190 e benignos menor que isso) mostrou uma sensibilidade de 69,70%, especificidade de 74,80%, Valor Preditivo Positivo de 83,04% e Valor Preditivo Negativo de 58,24% e Acurácia de 71,54% para diferenciar casos de nódulos benignos e malignos.

Em relação às lesões foliculares, na comparação de CFT *versus* AF (Figura 25) observamos que para o valor da média 85,430 como ponto de corte (grupo CFT maior ou igual a 85,430 e AF menor que isso), encontramos uma sensibilidade de 62,50%, especificidade de 73,10%, Valor Preditivo Positivo de 64,14% e Valor Preditivo Negativo de 71,69% e Acurácia de 68,49% na distinção de CFT e AF. A comparação de CPVF *versus* AF (Figura 26), para o valor de 75,600 como ponto de corte (grupo CPVF maior ou igual a 75,600 e AF menor que isso), mostrou uma sensibilidade de 65,20%, especificidade de 54,00%, Valor Preditivo Positivo de 56,58% e Valor Preditivo Negativo de 62,79% e Acurácia de 59,36% na distinção de CPVF e AF.

**Tabela 7.** Relações encontradas em diferentes diagnósticos histopatológicos de acordo com as análises de Imunoistoquímica semi-quantitativa de KAP-1.

Grupos Analisados	Valor de <i>p</i> (IHQ semi-quantitativa)	IHQ semi-quantitativa	Valores Preditivos		
		%	%		
		Sensibilidade	Especificidade	Positivo	Negativo
Maligno <i>versus</i> Benigno	<0,0001	75,65	50,44	75,65	50,44
CPCT <i>versus</i> Hiperplasia	<0,0001	77,69	56,14	80,16	52,46
CPCT <i>versus</i> AF	0,0028	77,69	44,64	76,52	46,30
CPCT <i>versus</i> Variantes	NS	NS	NS	NS	NS
CPVF <i>versus</i> Hiperplasia	0,0039	71,70	56,14	60,32	68,09
CPVF <i>versus</i> AF	NS	NS	NS	NS	NS
CPVF <i>versus</i> CFT	NS	NS	NS	NS	NS
CFT <i>versus</i> AF	NS	NS	NS	NS	NS
CFT <i>versus</i> Hiperplasia	0,0025	74,42	56,14	56,14	74,42
AF <i>versus</i> Hiperplasia	NS	NS	NS	NS	NS

Legendas: CPCT= forma clássica do CPT; CPVF= variante folicular do CPT; CFT= carcinoma folicular; FA= adenoma folicular; Variantes= CPVF + CPCA= variante de células altas; NS= não significativo.



Ponto de corte: 73,190

Sensibilidade: 69,70%

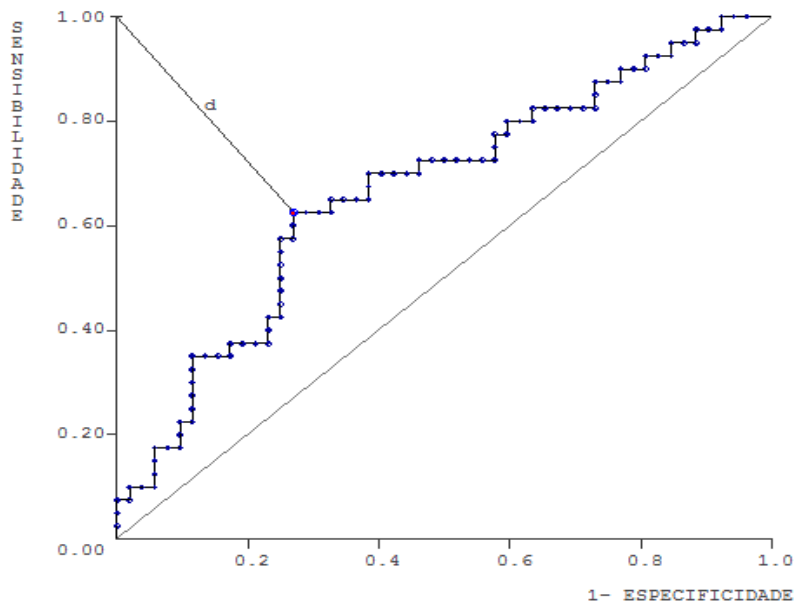
Especificidade: 74,80%

VPP: 83,04%

VPN: 58,24%

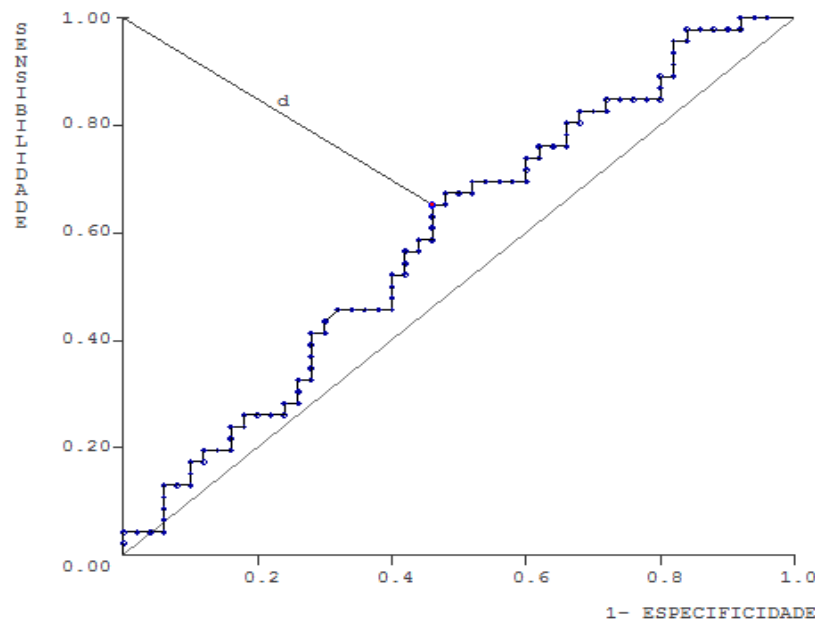
Acurácia: 71,54%

**Figura 24.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de KAP-1 em tecidos malignos *versus* benignos.



Ponto de corte: 85,430  
 Sensibilidade: 62,50%  
 Especificidade: 73,10%  
 VPP: 64,14%  
 VPN: 71,69%  
 Acurácia: 68,49%

**Figura 25.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de KAP-1 em CFT *versus* AF.



Ponto de corte: 75,600  
 Sensibilidade: 65,20%  
 Especificidade: 54%  
 VPP: 56,58%  
 VPN: 62,79%  
 Acurácia: 59,36%

**Figura 26.** Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da expressão proteica de KAP-1 em CPVF *versus* AF.

Observando todos os marcadores em conjunto, a co-expressão da MAGE A3, P53, MDM2 e KAP-1, diferenciam tecidos tireoidianos malignos de tecidos tireoidianos benignos ( $p < 0,0001$ ). A imunistoquímica semi-quantitativa (visual) dos 4 marcadores considerados em conjunto distingue malignidade com uma sensibilidade de 94%, especificidade de 67%, Valor Preditivo Positivo de 90% e Valor Preditivo Negativo de 86%.

Foi possível observar que as análises das técnicas de Imunistoquímica quantitativa (Acis) e semi-quantitativa (Visual) se complementam em nossos resultados, onde a análise semi-quantitativa nos dá Valores Preditivos Negativos elevados enquanto a análise quantitativa nos dá Valores Preditivos Positivos elevados.

## ***5. DISCUSSÃO***

---

Existem poucos trabalhos publicados a respeito da expressão proteica de MAGE A3 em Câncer de tireoide. Milkovic *et al.*,(60) estudaram a sua expressão em 60 tecidos tiroidianos incluindo 18 microcarcinomas. Demonstraram que a positividade de MAGE A3 foi mais frequente em carcinomas papilíferos menores que 1 cm, sugerindo assim que esta proteína poderia estar relacionada com a progressão do tumor. Em nosso estudo, este dado não foi confirmado uma vez que a expressão de MAGE A3 não se correlacionou com o tamanho do tumor. Já Cheng *et al.*, (61), utilizaram um anticorpo que reconhecia tanto MAGE A3 quanto MAGE A6 em 375 casos de tecidos tiroidianos sendo 53 metastáticos. Eles observaram que a expressão destas proteínas era maior nos casos de tumores maiores e com metástase, sugerindo que a família de MAGE possa estar relacionada com a progressão no câncer de tireoide. Em outro trabalho realizado por Liu *et al.*, (62) foi observado em um exame histopatológico de tecidos tiroidianos de ratos que havia uma coloração forte desta proteína em focos de metástases, fornecendo assim evidências adicionais de que esta proteína possa estar envolvida na formação de metástases. Embora nós tenhamos utilizado um anticorpo que reconhecia somente MAGE A3 e não tenhamos encontrado correlação da expressão de MAGE A3 com metástase, nós também observamos uma maior expressão de MAGE A3 na presença de invasão extratiroidiana. Mais ainda, demonstramos uma possível utilidade clínica previamente não relatada na literatura para a expressão de MAGE A3 na identificação de malignidade e na caracterização de lesões de padrão folicular.

Em relação aos estudos com p53, sabemos que a literatura classicamente relaciona a expressão desta proteína a tumores de tireoide mais agressivos, de maior potencial metastático e em estadios mais avançados (41). No entanto, trata-se de uma proteína



codificada por gene supressor tumoral que, em vários tipos de câncer, incluindo o câncer colo retal, de fígado, pulmão e outros, está expresso precocemente de forma fisiológica exercendo sua função de indutora de apoptose e destruidora de células neoplásicas (63,64,65). Morita *et al.*,(66), observaram que sua expressão se correlacionou com tumores maiores e com metástases linfonodais, diferente de nossos resultados, que mostraram uma relação de p53 com tumores menores que 2cm. Nossos dados, ao contrário dos de Morita *et al.*,(66), sugerem que p53 se expressa precocemente e desempenha sua função de supressor tumoral, possibilitando a parada do ciclo celular e apoptose de células mutadas. Esta hipótese é corroborada pelos resultados de Soares *et al.*, (67). Estes autores observaram uma elevada expressão de p53 em 79 casos de carcinomas diferenciados da tireoide e nenhuma correlação com agressividade. O mesmo foi observado por Balta *et al.*, (68) em 87 casos que também tiveram uma alta expressão de p53, principalmente em CPT, onde se assemelha ao nosso resultado quanto a positividade da proteína. No entanto estes autores sugerem que seria possível através de expressão de p53 prever um pior prognóstico destes casos. Nosso estudo sugere ao contrario, de que p53 está ligado a características de melhor prognóstico. Estas diferenças podem ser explicadas pelo viés que encontramos no trabalho de Balta *et al.*, (68), uma vez que a casuística destes autores possui uma quantidade de casos de alto risco muito maior ao que tradicionalmente observamos na prática clínica, além do estudo também ter incluído uma grande quantidade de indivíduos do sexo masculino o que, por si só já é um fator de risco de pior prognóstico (69).

Já com relação a MDM2, no estudo Jennings *et al.*, (50) foi demonstrado que MDM2 se encontrava expresso somente em CPT e não havia nenhuma positividade em tumores benignos e tecidos tireoidianos normais. Em nossos dados demonstramos que havia

positividade tanto em tumores malignos e quanto em lesões benignas da tireoide. No entanto, também não encontramos expressão de MDM2 em tecidos normais, o que vai de encontro com a literatura. Melck *et al.*, (42) não puderam demonstrar uma diferença significativa da expressão de MDM2 entre lesões malignas e benignas da tireoide, diferente de nossos resultados, onde mostramos que o perfil proteico de MDM2 pode diferenciar malignidade e também pode diferenciar algumas lesões de padrão folicular.

Quanto a KAP-1, não há nenhum estudo desta proteína através da técnica de imunistoquímica em CDT nem de sua utilidade clínica no diagnóstico e prognóstico desta doença. Demonstramos que KAP-1 estava mais expressa nos casos com nódulos malignos da tireoide. Estes dados estão em concordância com os de Yokoe *et al.*, (52), que estudaram a proteína em 90 casos de câncer gástrico através de imunistoquímica, demonstrando que KAP-1 foi expressa predominantemente no núcleo de células gástricas cancerígenas e também se correlacionou com um pior prognóstico, tendo os autores sugerido que esta proteína estaria relacionada a progressão tumoral por seus potenciais efeitos anti-apoptóticos. Embora nossos dados não tenham sugerido correlação desta proteína com o prognóstico dos pacientes com CDT, encontramos maior expressão em tumores maiores que 4 cm, levando-nos a sugerir que KAP-1 possa estar ligada a progressão tumoral, como também sugerido por Yokoe *et al.*, (52). HO *et al.*,(70) em câncer de mama em que, em 50 amostras de tecidos, a expressão de KAP-1 estava associada com metástase linfonodais. No entanto, HO *et al.*,(70) não conseguiram relacionar a expressão de KAP-1 com a sobrevida destas pacientes devido a falta de informações clínicas. Em nossos resultados, KAP-1 se correlacionou com seguimento, estando mais expresso em pacientes com recorrência, no entanto a sobrevida livre de doença calculada pelas curvas de sobrevivência de Kaplan-

Meier, com análise de log-rank não se mostrou significativamente afetada pela expressão de KAP-1 sugerindo a necessidade de aumentar o tamanho amostral para uma conclusão definitiva acerca do papel real de KAP-1 no CDT.

Estudos em carcinomas hepatocelulares sugerem que o aumento de KAP-1 pode reprimir genes associados a apoptose, ciclo celular e supressão tumoral, fazendo com que os tumores se desenvolvessem com maior facilidade (71).

Mais ainda, nossos resultados demonstraram, de forma inédita, que esta proteína pode diferenciar algumas lesões de padrão folicular e identificar malignidade. Um estudo de Kijanka *et al.*, (72) sugeriu que pacientes com carcinoma colorretal possuíam níveis de RNAm de KAP-1 mais altos do que pacientes sem câncer, sugerindo que esta proteína possa ter algum valor diagnóstico para lesões malignas. Nossos resultados, pioneiros em CDT, ainda necessitam confirmação em populações ainda maiores, mas dão bons indícios de que esta proteína possa ter algum valor diagnóstico e prognóstico nos CDT.

## ***6. RESUMO DOS ACHADOS***

---

Em resumo pudemos observar que:

- MAGE A3 identificou malignidade entre os casos de nódulos tiroidianos, sendo mais expresso nos tecidos malignos do que nos benignos. Pode também diferenciar algumas lesões de padrão folicular, principalmente Carcinoma Folicular da Tireoide e se correlacionou com invasão, mas não se correlacionou com nenhuma outra característica de má evolução.
- P53 identificou malignidade, sendo mais expresso nos tecidos malignos do que nos benignos. Pode também diferenciar algumas lesões de padrão folicular, estando mais presente em Carcinoma Papilífero de Variante Folicular da Tireoide e se correlacionou com o tamanho do tumor, mas não se correlacionou com nenhuma característica de má evolução.
- MDM2 identificou malignidade, sendo mais expresso nos tecidos malignos do que nos benignos. Pode também diferenciar algumas lesões de padrão folicular, em especial o Carcinoma Papilífero de Variante Folicular da Tireoide e se correlacionou com o tamanho do tumor e com característica de agressividade, mas não se correlacionou com nenhuma característica de má evolução.
- KAP-1 identificou malignidade, sendo mais expresso nos tecidos malignos do que nos benignos. Pode também diferenciar algumas lesões de padrão folicular. Correlacionou-se com o tamanho do tumor, e com característica de má evolução estando mais expresso em pacientes com recidiva, no entanto este dado perde sua estatística ao ser comparado com a sobrevivência dos pacientes.

- A co-expressão da MAGE A3, P53, MDM2 e KAP-1, diferenciam tecidos tireoidianos malignos de tecidos tireoidianos com bons valores de sensibilidade, especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo.

## ***7. CONCLUSÃO***

---

Nossos dados sugerem que o perfil proteico de MAGE A3, P53, MDM2 e KAP-1 podem auxiliar no diagnóstico, uma vez que diferencia lesões de padrão folicular e identifica malignidade. Sendo assim, estas proteínas podem fazer parte de um painel de marcadores que podem auxiliar no diagnóstico para câncer de tireoide.

Nossos dados também sugerem que a expressão de MAGE A3, P53, MDM2 não seja útil na predição de recidiva embora estas proteínas possam ser úteis na caracterização de agressividade relacionando-se com invasão extratiroidiana e tamanho do tumor, no entanto KAP-1 pode diferenciar pacientes com recidiva mais não pode relacionar este dado com a sobrevida. Mais uma vez, estes resultados indicam que um tratamento adequado com remoção completa do tumor seja o mais importante fator de prognóstico no CDT (13, 73).



## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

---

1. Tan GH, Gharib H. Solitary thyroid nodule. Comparison between palpation and ultrasonography. *Archives of Internal Medicine*. 1995; 155:2418-23.
2. Pinchera A. Thyroid incidentalomas. *Hormone Research*. 2007; 68 5:199-201.
3. Yang GC, Liebeskind D, and Messina AV. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of the thyroid assessed by Ultrafast Papanicolaou stain: data from 1135 biopsies with a two- to six-year follow-up. *Thyroid*. 2001; 11(6):581-9.
4. Yang V, Schnadig, and Logrono R. *et al.*, Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. *Cancer*. 2007; 111(5): 306-15.
5. Yu GP, Li JC, Branovan D, McCormick S, Schantz SP. Thyroid Cancer Incidence and Survival in the National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology and End Results Race/Ethnicity Groups. *Thyroid*. 2010; 20(5):465-73.
6. Kilfoy, B.A., et al., Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*. 2009.18(4): p. 1092-100.
7. SEER, Cancer Statistics Review 1975-2008. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2008,2011](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008,2011).
8. Ward LS and Graf H. Câncer da tiróide: aumento na ocorrência da doença ou simplesmente na sua detecção? *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2008; 52(9):1515-1516.
9. Mazzaferri EL. What is the optimal initial treatment of low-risk papillary thyroid cancer (and why is it controversial)? *Oncology (Williston Park)*. 2009; 23(7): 579- 88.

10. Instituto Nacional do Câncer (INCA)- Incidência do Câncer no Brasil, estimativa 2012. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. 2010 Aug;consultado em 18/06/2012.
11. Coeli, C.M., et al., [Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2005. 49(4): p. 503-9.
12. Welker, M.J. and D. Orlov, Thyroid nodules. *American Family Physician*. 2003. 67(3): p. 559-66.
13. Morari EC, Silva JR, Guilhen AC, Cunha LL, Marcello MA, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Muc-1 expression may help characterize thyroid nodules but does not predict patients' outcome. *Endocrine Pathology*. 2010; 21(4):242-9.
14. Yang GC, Liebeskind D, and Messeina AV. Should cytopathologists stop reporting follicular neoplasms on fine-needle aspiration of the thyroid?. *Cancer*. 2003; 99(2):69-74.
15. Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, Tomoda C, Takamura Y, Kobayashi K, Miya A. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World Journal of Surgery*. 2010; 34(1): 28-35.
16. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *Cancer Journal of Clinicians*. 2010; 60(5): 277-300.
17. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*. 1988;104(6):947-53.
18. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral Lobectomy Versus Bilateral Lobar Resection in Papillary Thyroid-Carcinoma - a Retrospective Analysis of

Surgical Outcome Using a Novel Prognostic Scoring System. *Surgery*. 1987;102(6):1088-95.

**19.** 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(6):1050-7; discussion 7-8.).

**20.** Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; 321:86-93.

**21.** American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009; 19(11):1167-214.

**22.** Pitoia F, Ward L, Wohllk N, Friguglietti C, Tomimori E, Gauna A, Camargo R, Vaisman M, Harach R, Munizaga F, Corigliano S, Pretell E, Niepomnische H Recommendations of the LatinAmerican Thyroid Society on diagnosis and management of differentiated thyroid cancer. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2009; 53-7.

**23.** Ward LS, Maciel RM, Camargo RY, Carvalho GA, Graf H, Tomimori E, Maia AL, Kimura ET, Vaisman M, Andrada NC. Câncer diferenciado da tiróide: diagnóstico, capítulo do livro Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina

(editores). Editora AMB/CFM 2011–disponível em <http://www.projetodiretrizes.org.br/>. ISBN 9788563059024.

- 24.** Maciel RMB. Tumorigênese Molecular Tiroideana: Implicações Para a Prática Médica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2002; 4, 381-390.
- 25.** Cerutti JM. Nódulos com Diagnóstico de Padrão Folicular: Marcadores Biológicos São o Futuro?. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2007;51/5.
- 26.** Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Science*. 2009; 100:2014-21.
- 27.** Miranda EI. MAGE, biological functions and potential clinical applications. *Leukemia Research*. 2011; 34: 1121-1122.
- 28.** Zendman AJ, Ruitter DJ, Van Muijen GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *Journal of Cellular Physiology*. 2003; 194(3): 272-88.
- 29.** Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5(8):615-25.
- 30.** Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immunity*. 2001; 30; 1:1.
- 31.** Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells*. 2007, 25(3):707-11.

- 32.** De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora J-P, De Smet C, et al. Structure, chromosomal localization and expression of twelve genes of the MAGE family. *Immunogenetics*. 1994; 40: 360–9.
- 33.** Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J. Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to –A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *International Journal of Oncology*. 2005; 26:817–24.
- 34.** Yang B, O’Herrin S, Wu S. *et al.* Select Cancer Testes Antigens of the MAGE-A,-B, and -C Families Are Expressed in Mast Cell Lines and Promote Cell Viability In Vitro and In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007, 127, 267-275.
- 35.** Yang B, Wu J, Maddodi N. *et al.* Epigenetic Control of MAGE Gene Expression by the KIT Tyrosine Kinase. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007, 127, 2123-2128.
- 36.** Gaugler B, Van denEynde B, Van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994; 179(3):921–30.
- 37.** Martinez A, Olarte I, Mergold MA, Gutierrez M, Rozen E, Collazo J, *et al.* mRNA expression of MAGE-A3 gene in leukemia cells. *Leukemia Research*. 2007;31:33–7.
- 38.** Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M. P53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews*. 2009, 9; 95-107.

- 39.** Kamihira S, Terada C, Sasaki D et al. Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. *European Journal of Haematology*. 2009, 82; 301-307.
- 40.** Iacopetta B, Russo A, Bazan V et al. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Annals of Oncology*. 2006, 17; 842-847.
- 41.** Ward LS, Fagin JÁ. Molecular genetics of thyroid cancer: evidence tht inactivation of tumor supressor genes occurs at late stages of tumor progression. In: The molecular and cellular basis of pediatric endocrinology. *The Humana Press Inc, Totowa, NJ*.1998, chapter 12, p. 201-211.
- 42.** Melck A, Masoudi H, Griffith OL, Rajput A, Wilkins G, Bugis S, Jones SJ, Wiseman SM. Cell cycle regulators show diagnostic and prognostic utility for differentiated thyroid cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2007; 14(12):3403-11.
- 43.** Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nature Reviews.Immunology*. 2008; 8(11): 849–860.
- 44.** Yang BSM, W J O’Herrin, Reagan-Shaw S, MA Y, Bhat KM, Gravkamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley B JL. MAGE-A, MAGE-B, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53 dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Research*. 2007; 67 9954–9962.

- 45.** Xu Li X, Lee Y, Jeng J, et al. Role for KAP1 Serine 824 Phosphorylation and Sumoylation/Desumoylation Switch in Regulating KAP1-mediated Transcriptional Repression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282(50), 36177–36189.
- 46.** Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology*. 2003 ;13(1):49-58.
- 47.** Theobald M and Offringa K. Anti-p53-directed immunotherapy of malignant disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2003; 5(11):1-13.
- 48.** Freedman DA, Levine AJ. Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein--thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research*. 1999; 1;59(1):1-7.
- 49.** Horie S, Maeta H, Endo K, Ueta T, Takashima K, Terada T. Overexpression of p53 protein and MDM2 in papillary carcinomas of the thyroid: Correlations with clinicopathologic features. *Pathology International*. 2001;51(1):11-5.
- 50.** Jennings T, Bratslavskiy G, Gerasimov G, Troshina K, Bronstein M, Dedov I, Alexandrova G, Figge J. Nuclear accumulation of MDM2 protein in well-differentiated papillary thyroid carcinomas. *Experimental and Molecular Pathology*. 1995; 62(3):199-206.
- 51.** Iyengar S, Farnham PJ. KAP1 Protein: An Enigmatic Master Regulator of the Genome. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(30): 26267-26276.



- 52.** Yokoe T, Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2010; 17(13): 821–828.
- 53.** Silva FP, Hamamoto R, Furukawa Y, Nakamura Y. TIPUH1 encodes a novel KRAB zinc-finger protein highly expressed in human hepatocellular carcinomas, *Oncogene*. 2006; 25(36); 5063–5070.
- 54.** Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, Lin L, Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Lizyness ML, Kuick R, Hayasaka S, Taylor JM, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nature Medicine*. 2008; 8(8):816–824.
- 55.** Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, Rauscher FJ, Chen J. MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *The EMBO Journal*. 2008;24(18): 3279–3290.
- 56.** Okamoto K, Kitabayashi I, Taya Y. KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 2006;351(1): 216–222.
- 57.** Zhu X, Asa SL, Ezzat S. Fibroblast Growth Factor 2 and Estrogen Control the Balance of Histone 3 Modifications Targeting MAGE-A3 in Pituitary Neoplasia. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14(7), 1894-1996.
- 58.** Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell*. 2010;39(6):963-74.

- 59.** Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumors, 7<sup>th</sup> Edition. 2009; 336.
- 60.** Milkovic M, Sarcevic B, Glavan E. Expression of MAGE Tumor-Associated Antigen in Thyroid Carcinomas. *Endocrine Pathology*. 2006; 17(1):45-52.
- 61.** Cheng S, Liu W, Mercado M, Ezzat S, Asa SL. Expression of the melanoma-associated antigen is associated with progression of human thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2009; 16: 455-466.
- 62.** Liu W, Cheng S, Asa SL, and Ezzat S. The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Research*. 2008, 68, 8104–8112.
- 63.** Tudek B, Speina E Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. *Mutation Research*. 2012. [Epub ahead of print];
- 64.** Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, Richard N, Antoine M, Rouquette I, Favrot MC, Debieuvre D, Braun D, Westeel V, Quoix E, Brambilla E, Hainaut P, Moro-Sibilot D, Morin F, Milleron B, Zalcman G; Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clinical Cancer Research*. 2012; 18(10):2976-86;
- 65.** Hayashi A, Yashima K, Takeda Y, Sasaki S, Kawaguchi K, Harada K, Murawaki Y, Ito H. Fhit, E-cadherin, p53, and AID expression in endoscopically resected early stage

esophageal squamous neoplasia. *Journal of Gastroenterology Hepatology*. 2012. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07216.x.

**66.** Morita N, Ikeda Y, Takami H. Clinical significance of p53 protein expression in papillary thyroid carcinoma. *World Journal of Surgery*. 2008, 32(12): 2617-22.

**67.** Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology*. 1994;24(3):205-10.

**68.** Balta AZ, Filiz AI, Kurt Y, Sucullu I, Yucel E, Akin ML .Prognostic value of oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Medicine Oncology*. 2012; 29(2): 734-41.

**69.** Marcello MA, Morari EC, Ward LS. P53 protein profile by IHC may be helpful to define patient Prognosis. *Medical Oncology*. DOI 10.1007/s12032-012-0282-0. 2012

**70.** Ho J, Kong JWF, Choong LY, Loh MCS, Toy W, Chong PK, Wong CH, Wong CY, Shah N, Lim YP, Novel Breast Cancer Metastasis-Associated Proteins. *Journal of Proteome Research* .2009, 8, 583–594.

**71.** Silva, FP, Hamamoto, R, Furukawa, Y, Nakamura, Y. TIPUH1 encodes a novel KRAB zinc-finger protein highly expressed in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene*. 2006; 25, 5063–5070.

**72.** Kijanka G, Hector S, Kay EW, Murray F, Cummins R, Murphy D, MacCraith BD, Prehn JH, Kenny D. Human IgG antibody profiles differentiate between symptomatic

patients with and without colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010; 59 (1):69-78.

**73.** Morari EC, Marcello MA, Guilhen AC, Cunha LL, Latuff P, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Use of sodium iodide symporter expression in differentiated thyroid carcinomas. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2011; 75(2):247-54.