



**PRISCILA PEREIRA COSTA DE ARAUJO**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
GRELINA NO CARCINOMA PAPILÍFERO DA  
TIROIDE - UM NOVO MARCADOR DE  
PREDISPOSIÇÃO?**

**CAMPINAS  
2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**PRISCILA PEREIRA COSTA DE ARAUJO**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA  
GRELINA NO CARCINOMA PAPILÍFERO DA  
TIROIDE - UM NOVO MARCADOR DE  
PREDISPOSIÇÃO?**

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Laura Sterian Ward**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL

DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PRISCILA PEREIRA  
COSTA DE ARAUJO E ORIENTADA PELO PROFA. DRA. LAURA  
STERIAN WARD.

Assinatura do Orientador

-----

**CAMPINAS**  
**2013**

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

Araujo, Priscila Pereira Costa, 1976-  
Ar15e Estudo da expressão da proteína grelina em carcinoma papilífero da tireoide :  
um novo marcador de predisposição? / Priscila Pereira Costa Araujo. – Campinas,  
SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Laura Sterian Ward.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Ciências Médicas.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Obesidade. 3. Grelina. 4. Predisposição  
genética para doença. 5. Carcinoma diferenciado da glândula tireoide. I. Ward,  
Laura Sterian, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Ghrelin expression study in papillary thyroid carcinoma :  
a novel susceptibility marker?

**Palavras-chave em inglês:**

Thyroid neoplasms

Obesity

Ghrelin

Genetic predisposition to disease

Thyroid Carcinoma, Nonmedullary 1

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutora em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Laura Sterian Ward [Orientador]

Claudio Roberto Cernea

Claudio Saddy Rodrigues Coy

Luiz Fernando Dias

Albina Messias de Almeida M. Altemani

**Data de defesa:** 03-07-2013

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

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**PRISCILA PEREIRA COSTA DE ARAUJO**

**Orientador (a) PROF(A). DR(A). LAURA STERIAN WARD**

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). LAURA STERIAN WARD

2. PROF(A). DR(A). CLAUDIO SADDY RODRIGUES COY

3. PROF(A). DR(A). ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA M. ALTEMANI

4. PROF(A).DR(A). CLAUDIO ROBERTO CERNEA

5. PROF(A).DR(A). FERNANDO LUIZ DIAS

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

**Data: 03 de julho de 2013**

## DEDICATÓRIA

---

À minha mãe Célia, que me ensinou o poder do amor sobre todas as coisas, o que me foi muito útil na condução de momentos cruciais em nossas vidas;

Ao meu pai Arivaldo, que me ensinou a ter fé e nela perseverar, ainda que de modo diferente do originalmente ensinado e à luz das mudanças e evolução deste mundo;

Ao meu marido e mentor Alfio, amor da minha vida, companheiro de todas as horas e co-orientador deste trabalho mesmo que informalmente, sem o qual o mesmo nunca teria a qualidade almejada. Apoio fiel das horas difíceis, e houveram muitas; amigo na caminhada, severo e racional quando necessário, mas também fonte de consolo inesgotável no momento que eu mais precisei, e sem o qual não estaria terminando este trabalho.

Aos meus irmãos, Mariane e Adriano, meus tios Sérgio e Neyde e minha avó Maria (*in memoriam*), que completam a minha família. A toda a (grande) família de meu pai; ao querido casal Andrea e Marcelo, meus “compadres”, que me deram um dos presents mais belos desta vida que é o sorriso de uma de minhas afilhadas, Marcella;

Às minhas afilhadas Marcella e Carolina, fonte de amor inesgotável e aprendizado contínuo conforme seu crescimento e desenvolvimento; devo muito ao amor delas que, tão pequenas ainda, já muito me ensinaram e tem me ajudado a seguir após longa turbulência; seus sorrisos significam muito para mim.

E, finalmente, à Profa. Dra. Laura, pela (muita) paciência e experiência colocada a meu serviço durante a elaboração deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

---

À Profa. Dra. Laura, pelo incentivo nas horas difíceis e pela cobrança nas horas de esmorecimento, auxiliando no possível e no impossível e colaborando definitivamente para a minha evolução como médica e cientista.

Ao meu marido Alfio pela grande experiência, da qual um pouco emprestei para a confecção desta tese.

À estatística Sirlei Morais pelo enorme trabalho que teve em gerar dados confiáveis.

À bióloga Marjory Alana Marcello pelo enorme auxílio na confecção das referências para esta tese e por todo o trabalho e apoio empregado nas horas difíceis; a todos os alunos do laboratório sem o qual este trabalho não terminaria, cada um colaborando com um pouco para que pudéssemos ver os resultados;

Às muitas pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram até a chegada neste momento crucial em minha vida.

E finalmente aos inúmeros pacientes que, com esperança e confiança em nosso trabalho, concordaram em ceder um pouco de si mesmos para a evolução da ciência numa hora de decisões tão difíceis.

“Perca com classe, vença com ousadia, porque o mundo pertence  
a quem se atreve”

**CHARLES CHAPLIN**

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xviii
<b>LISTA DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS</b> .....	xx
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>I.1.CONCEITOS</b> .....	25
I.1.1. A Epidemia da Obesidade.....	25
I.1.2.Câncer e Obesidade.....	27
I.1.3. Marcadores Inflamatórios na Obesidade.....	29
I.1.4. O Peptídeo Grelina.....	30
I.1.5. Grelina em Condições Patológicas.....	32
I.1.6. Grelina em Estados de Disfunção Tireoidiana.....	36
I.1.7. Grelina e Proliferação Celular na Célula Tireoidiana.....	38
I.1.8. Importância do Rastreamento de Câncer nos Nódulos de Tireoide.....	38
<b>II.HIPÓTESES</b> .....	43
<b>III.OBJETIVOS</b> .....	45
<b>IV. SUJEITOS E MÉTODOS</b> .....	47
<b>IV.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES</b> .....	48

IV.1.1. Critérios de inclusão e exclusão .....	48
IV.1.2. Coleta de dados clínicos e histopatológicos.....	49
<b>IV.2.DESCRITIVA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....</b>	<b>50</b>
IV.2.1. Dos portadores de nódulos malignos .....	51
IV.2.2.Das Lesões Benignas .....	51
<b>IV.3. MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
IV.3.1. Coleta de sangue para a dosagem sérica de grelina.....	52
IV.3.2. Técnica de ELISA ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> ).....	52
IV.4.3.1. Protocolo Geral .....	53
IV.4.3.1.1. Preparação do Plaqueamento.....	53
IV.4.3.1.2. Ensaio.....	54
IV.3.3.Imunoistoquímica.....	55
IV.3.4. Cirurgia e Seguimento dos 112 doentes (malignos e benignos).....	56
IV.3.4.1. Cirurgia.....	56
IV.3.4.2. Seguimento dos pacientes com câncer.....	57
IV.3.4.3. Análise Estatística.....	58
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
V.1. Das dosagens séricas (ELISA).....	61
V.2. Expressão Tecidual (IHQ).....	61

<b>VI. DISCUSSÃO</b> .....	77
VI.1. Generalidades.....	78
VI.2. Contribuição do Trabalho Atual.....	79
VI.3. A expressão de grelina e outros marcadores.....	82
<b>VII. CONCLUSÃO</b> .....	88
<b>VIII. REFERÊNCIAS</b> .....	90
<b>IX. ANEXOS</b> .....	96

## RESUMO

---

**INTRODUÇÃO:** As doenças da tireoide são bastante frequentes na população. O carcinoma diferenciado da tireoide tem aumentado significativamente nos últimos anos, além de ser o tipo mais comum na região da cabeça e pescoço, acometendo cerca de um a 13 indivíduos para cada mil habitantes com importantes diferenças geográficas de prevalência. Embora haja atualmente um melhor acesso ao sistema de saúde, bem como amplo uso de metodologias cada vez melhores e mais sensíveis na detecção das doenças tireoidianas (responsável por parte do aumento de sua incidência), há sabidamente a influência de fatores ambientais e outras comorbidades consideradas fatores de risco, como radiação ionizante, substâncias químicas, alterações dietéticas específicas (como a deficiência endêmica de iodo) e também inespecíficas (como doenças decorrentes do estilo de vida atual, potencializadas pelo sedentarismo e ingestão inadequada de nutrientes) agregando doenças que influem no estado imunológico, aumentando a suscetibilidade a doenças, dentre elas o câncer. A obesidade e sua crescente incidência, para além desses fatores ambientais, tem se mostrado fator de predisposição importante e independente para vários tipos de neoplasias malignas. No caso do câncer de tireoide, esta associação ainda é controversa. A literatura já demonstrou a relação entre obesidade em câncer de tireoide em subgrupos específicos, mas ainda carece de dados mais concretos e marcadores que possam rastrear estas populações de risco em nível global.

O peptídeo grelina é um peptídeo orexígeno produzido nas células gástricas com liberação sérica e ação central e periférica, com funções relacionadas ao mecanismo de obesidade. Por este motivo, apresenta-se como um bom candidato a marcador da relação entre obesidade e câncer.

**SUJEITOS E MÉTODOS:** Este trabalho analisou a associação entre pacientes portadores de sobrepeso ou obesidade e carcinoma diferenciado da tireoide através das técnicas de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e imunoistoquímica para a determinação de níveis séricos e expressão de grelina tecidual em um grupo de 112 pacientes portadores de nódulos tireoidianos, dos quais 59 eram benignos e 53 malignos, todos submetidos à tireoidectomias e seguidos por 10 a 216 meses ( $82,28 \pm 43,85$  meses). Correlacionou-se a ocorrência de alterações deste peptídeo com a susceptibilidade e a predisposição ao câncer da tireoide para obesos e não obesos e para o subgrupo microcarcinoma ( $\leq 10$  mm).

**RESULTADOS:** Dos 112 pacientes da casuística, 26,7% eram obesos (IMC  $>29,9$  Kg/m<sup>2</sup>), com média de idade de  $29,2 \pm 1,7$  anos para o sexo masculino e de  $32,9 \pm 1,2$  anos para o feminino; como esperado, houve correlação positiva entre grelina e obesidade ( $p < 0,001$ ), porém a curva ROC não apresentou poder discriminatório para malignidade na amostra estudada ( $p = 0,4492$ ). Verificou-se baixa sensibilidade (67,9%) e especificidade (39%), porém a expressão imunoistoquímica foi capaz de diferenciar malignidade na amostra estudada ( $p = 0,024$ ). Não houve correlação significativa entre níveis séricos e/ou da expressão de grelina com nenhuma das

variáveis clínicas. Apenas a presença de auto-anticorpos apresentou tendência significativa ( $p=0,09$ ).

**CONCLUSÃO:** Os níveis séricos de grelina dosados na amostra estudada não auxiliaram na discriminação de malignidade, porém sua expressão imunistoquímica apresentou importante relação entre esta e o diagnóstico de malignidade. As concentrações séricas de grelina diferiram quantitativamente e apresentaram baixa especificidade como marcadoras, tanto para o grupo maligno em geral quanto para o subgrupo dos microcarcinomas. Apesar da ausência de correlação entre os níveis séricos e câncer, quando analisamos os dados de expressão observa-se que há poder discriminatório para malignidade na amostra estudada.

**Palavras-chave:** Tireoide – Câncer, Obesidade, Grelina, Câncer Diferenciado de Tireoide

## ABSTRACT

---

**BACKGROUND:** Thyroid diseases are very frequent. Differentiated thyroid cancer has significantly improved in the last twenty years, being the most common cancer on head and neck region, ranging from 1 to 13/1000 inhabitants on average, with important prevalence features. There is an influence of environmental factors like radiation, chemical components, iodine deficiency, as well as other morbidities and actual changes in lifestyle, in which sedentary lifestyle and diet changes take place causing a synergistic effect, with improvement of risk factors for various diseases including cancer. The recent epidemic of obesity and its rising incidence has been shown to be a very important susceptibility factor to many malignant neoplasms. Regarding thyroid cancer, this association is still controversial, and so far is known that during tumor progression thyroid cells are certainly influenced by the pro-inflammatory status commonly observed in these patients. Data on literature has demonstrated the relationship between obesity and thyroid cancer in specific subgroups, but there is lack of concrete data about susceptibility markers to globally screen this population at risk. Ghrelin is an orexigen peptide produced by gastric cells with central and peripheral actions, released on blood stream with obesity control functions. Because of these features, it is a good potential marker of the obesity-cancer relationship.

**ESPÉCIME/METHODS:** Association between obese and overweight patients and differentiated thyroid cancer was analyzed using *ELISA* (*enzyme-linked immunosorbent assay*) and immunohistochemical techniques, to verify the expression and serum levels of ghrelin protein in 112 patients harboring thyroid nodules (59 benign and 53 malignant), all submitted to thyroidectomies and followed for 10 a 216 months ( $82,28 \pm 43,85$  months). Correlations among ghrelin alterations and diagnostic and susceptibility to thyroid cancer were made for obese and non-obese patients and for a micro carcinoma-specific group selected for study ( $\leq 10$ mm). The findings of immunohistochemical expression and ghrelin serum levels in selected cases were used for comparisons and the formulation of hypothesis.

**RESULTS:** 26,7% of the 112 patients were obese (BMI  $>29,9$  Kg/m<sup>2</sup>), with average age  $29,2 \pm 1,7$  years (male patients) and  $32,9 \pm 1,2$  years (female). As postulated, there was a relationship between ghrelin levels and obesity ( $p < 0,001$ ), but ROC curve did not show discriminatory power for malignancy ( $p = 0,0492$ ). Low sensitivity (67,9%) and specificity (39%) rates were found, and there was no statistical association among ghrelin (expression and/or serum levels) and clinical variables. The presence of auto antibodies presented an important trend ( $p = 0,09$ ). The relationship between immunohistochemical expression and cancer was significant ( $p = 0,024$ ).

**CONCLUSION:** Ghrelin serum levels did not help to discriminate malignancy on this serie, but the immunohistochemical expression showed important correlation between malignancy and cancer risk. Serum levels differed quantitatively and presented low sensitivity and specificity, not only for micro carcinoma but also for the whole tumors group. Despite the absence of association between serum levels and cancer, the expression data shows discriminatory power at the study and can be a potential marker for thyroid malignancy.

**Keywords:** Thyroid Neoplasms, Obesity, Ghrelin, Genetic predisposition to disease, Differentiated Thyroid Cancer

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AFP – Alfa-feto proteína

CDT – Carcinoma diferenciado da tireoide

°C – graus Celsius

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GH – *Growth Hormone*, ou fator de crescimento

GHRH – *Growth Hormone releasing hormone* (ou Hormônio Liberador de GH)

GHS-R – *Growth hormone secretagogue receptor*

IARC – *International Agency for Research in Cancer*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC – Índice de Massa Corporal

IRC – Insuficiência renal crônica

Kg/m<sup>2</sup> – Quilogramas por metro quadrado

mCi – Milicuries

mm – milímetros

M – Molar

mRNA – RNA mensageiro (RNA – *ribonucleic acid*, ou ácido ribonucleico)

$\mu\text{L}$  – microlitros

$\mu\text{m}$  – micrômetros

ng/mL – Nanogramas por mililitro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCI – Pesquisa de corpo inteiro

pmol/L – Pico moles por litro

RIT - Radioiodoterapia

ROC – *Receiver operating characteristic*

T3 – Triiodotironina

T4 – Levotiroxina

TNM – *Tumor Nodal Metastasis*

TSH – *Thyroid stimulating hormone* (ou Hormônio tireo-estimulante)

UICC – *Union for International Cancer Control*

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

---

**FIGURA 1.** Sequência de aminoácidos da grelina humana. Notar a modificação do resíduo serina na posição 3 e 2 trocas de aminoácidos nas posições 11 e 12 que a diferem da grelina do rato.....8

**FIGURA 2.** Fisiologia da regulação do apetite pelos peptídeos leptina e grelina. Notar a estreita correlação entre grelina (secretada pelas células endócrinas do fundo gástrico) e leptina (secretada no tecido adiposo) , com efeitos opostos (orexígeno e anorexígeno, respectivamente).....12

**FIGURA 3.** Distribuição dos 112 pacientes da casuística demonstrando os diagnósticos histológicos à amostragem final considerada para estudo.....26

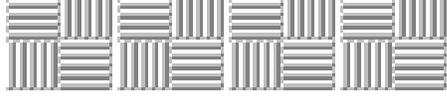
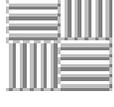
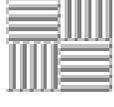
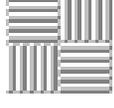
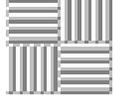
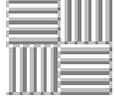
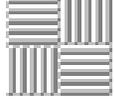
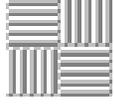
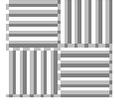
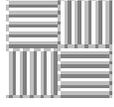
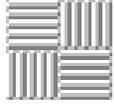
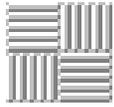
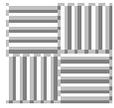
**FIGURA 4.** Resultado visual da técnica de *ELISA* para ilustração, demonstrando a imuno-reatividade final em alguns poços da placa após a sequência de ensaio (em amarelo). Retirado de [www.virology-online.com](http://www.virology-online.com).....30

**TABELA 1.** Correlação das dosagens séricas com aspectos clínico-patológicos da casuística.....39

**TABELA 2.** Dosagens séricas de grelina x IMC para os 112 pacientes estratificados por características clínicas da amostra.....40

<b>GRÁFICO 1.</b> Dosagens séricas de grelina e sua correlação com IMC frente ao diagnóstico de malignidade.....	41
<b>GRAFICO 2.</b> Curva ROC apresentando a distribuição dos 112 casos estudados para a dosagem sérica de grelina.....	42
<b>TABELA 3.</b> Grelina Sérica e Risco para Câncer.....	43
<b>TABELA 4.</b> Dosagens Séricas de Grelina para os 53 nódulos malignos e variantes.....	44
<b>TABELA 5.</b> Dosagens Séricas para os 53 nódulos malignos e variáveis séricas do tumor.....	45
<b>TABELA 6.</b> Análise variáveis dos microcarcinomas e aspectos teciduais.....	46
<b>GRÁFICO 3.</b> Dosagens Séricas de Grelina para os 28 Carcinomas e Variáveis Clínicas.....	47
<b>TABELA 7.</b> Dosagens Séricas de Grelina para os 28 microcarcinomas e características Clínicas dos pacientes.....	48
<b>TABELA 8.</b> Análise das Características Histológicas dos microCDT.....	49
<b>FIGURA 5.</b> Imunoistoquímica em um dos bócios da amostra, expressando pouca reatividade para grelina (200x).....	50
<b>FIGURA 6.</b> Imunoistoquímica em um dos carcinomas papilíferos da amostras, expressando forte reatividade para grelina (200x).....	51
<b>TABELA 9.</b> Análise para algumas variáveis Clínicas.....	52
<b>TABELA 10.</b> Expressão Tecidual e Diagnóstico.....	53
<b>TABELA 11.</b> Resultado Final da Expressão de Grelina Exemplificando alguns do resultados obtidos utilizando-se o Score descrito por Rossi.....	57





# I. Introdução

## I. INTRODUÇÃO

---

O conceito de obesidade como um estado inflamatório já é bem estudado e investigado na área médica atualmente, sendo definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma enfermidade caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal podendo ser associada a inúmeros problemas de saúde <sup>(2)</sup>. A obesidade tem estado em pauta por conta do aumento de sua incidência mundial, tendo a medicina voltado seu olhar para este assunto gerando estudos nesta área do conhecimento. Uma série de evidências clínico-epidemiológicas vêm estabelecendo sua correlação uma série de condições patológicas, entre estas a hiperinsulinemia, o diabetes mellitus, outros estados metabólicos e finalmente o câncer.

De acordo com a OMS, o câncer da tireoide é a quinta neoplasia mais frequente entre as mulheres brasileiras e a 17ª entre os homens, atingindo cerca de 1% da incidência total dentre todos os tumores endócrinos. <sup>(3)</sup>. Observa-se neste contexto um aumento relevante da incidência dos carcinomas diferenciados da tireoide (CDT), que correspondem à maior porcentagem de relevância dentre todos os casos, refletindo o ritmo de seu crescimento em todo o mundo ocidental.

Há evidências de que portadores de câncer de tireoide possam apresentar resistência à insulina, sugerindo uma possível existência de vias de expressão gênicas comuns <sup>(4)</sup>.

## I.1. CONCEITOS

---

### *I.1.1. A epidemia da Obesidade*

A obesidade vem sendo considerada uma epidemia mundial, presente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, atingindo indivíduos de todas as idades e grupos socioeconômicos <sup>(5, 6)</sup>. O aumento de sua incidência está distribuído por quase todos os sexos e raças, afetando principalmente a população de 25 a 44 anos <sup>(7)</sup>. O excesso de peso atinge cerca de 1/3 da população adulta e apresenta uma tendência cada vez mais crescente nas últimas décadas <sup>(8)</sup>.

Sabe-se que fatores genéticos e ambientais estão implicados na ocorrência da obesidade <sup>(9)</sup>, havendo a sugestão de uma herança poligênica e multifatorial em sua gênese <sup>(10)</sup>. Dentre os fatores ambientais, destacam-se a ingestão alimentar inadequada e a falta de atividades físicas, sendo possível também que fatores psicológicos apresentem grande relevância em determinado número de pacientes, com as variáveis nutricionais, metabólicas e psicossociais interagindo entre si e com os fatores genéticos, acarretando no desenvolvimento do fenótipo da obesidade <sup>(11)</sup>.

A OMS estima que haja no mundo mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, quando o índice de massa corporal (IMC) está entre 25,1 e 29,9 Kg/m<sup>2</sup>, e que destes, aproximadamente, 300 milhões são obesos (IMC > 29,9 Kg/m<sup>2</sup>) <sup>(12)</sup>. No Brasil, a obesidade atinge aproximadamente 40% da população adulta, sendo estimada em

38,6 milhões de pessoas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Destes, 18 milhões são considerados obesos mórbidos <sup>(13)</sup>.

Segundo o Consenso Latino Americano de Obesidade, cerca de 200 mil pessoas morrem por ano devido a doenças associadas ao excesso de peso, sendo que, nos Estados Unidos, este número está em torno de 300 mil pessoas <sup>(14)</sup>. Está também em ascensão em países de baixa e média renda, especialmente em áreas urbanas.

O aumento global do sobrepeso e da obesidade é atribuível a uma série de fatores, incluindo uma mudança nos perfis dietéticos em conjunto com uma tendência à diminuição da atividade física, devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho. Porém existem poucas evidências de que algumas populações sejam mais suscetíveis à obesidade por motivos genéticos, o que reforça serem os fatores alimentares responsáveis pela diferença na prevalência da obesidade em diferentes grupos populacionais. <sup>(15)</sup>. Dentre as principais consequências para a saúde temos doenças cardiovasculares e o diabetes, distúrbios osteomusculares e alguns tipos de câncer - como endométrio, mama e cólon, dentre outros.

Há evidências sugerindo forte influência genética no desenvolvimento da obesidade, mas seus mecanismos ainda não estão esclarecidos. O controle do apetite e o comportamento alimentar também sofrem influência genética, mas problemas psicológicos também estão associados ao ganho de peso, como por exemplo, estresse e ansiedade <sup>(16)</sup>, que influenciando principalmente o comportamento

alimentar, tornam-se gatilhos para a ocorrência da doença <sup>(17)</sup>. Além disso, deve-se considerar que há diferenças individuais na suscetibilidade à obesidade <sup>(7)</sup>. Anormalidades endócrinas como a síndrome dos ovários policísticos também podem conduzir à obesidade, mas estas causas representam menos de 1% dos casos de excesso de peso.

### ***1.1.2. Câncer e obesidade***

Embora o ambiente possa contribuir para a ocorrência dos casos de obesidade, é provável que o fator mais importante seja um perfil genético herdado. Um número crescente dessas mutações e desses polimorfismos populacionais vem sendo identificados, tornando necessário entender como eles interagem com os fatores de risco ambientais levando a um aumento na predisposição tanto da obesidade como de seus estados patológicos associados.

A ocorrência de câncer é fortemente influenciada por fatores ambientais, tais como dieta, estado nutricional, tabagismo, etilismo, viroses e exposições ambientais e ocupacionais <sup>(18)</sup>. Muitos estudos epidemiológicos têm observado a presença de associações entre obesidade e incidência ou mortalidade por determinadas neoplasias, embora alguns resultados sejam ainda controversos.

A investigação de mecanismos orgânicos inerentes ao processo de ganho de peso e carcinogênese geram linhas interessantes para pesquisa. Os efeitos

metabólicos e endocrinológicos da obesidade e as alterações que induzem a produção de peptídeos, hormônios e inflamação são bons pontos comuns de partida que ligam estas duas fisiodoenças, gerando espécime interessante para estudo. Os mecanismos fisiopatológicos e biológicos subjacentes a estas interações estão apenas começando a ser compreendidos.

Embora a obesidade seja reconhecida como importante causa de diabetes e doença cardiovascular, sua associação com a ocorrência de diferentes tipos de câncer é pouco elucidada, apesar de já enfaticamente demonstrada em estudos preliminares. Com efeito, acredita-se que a obesidade atualmente seja a causa de 15 a 20% de todos os cânceres nos Estados Unidos, constituindo-se desta maneira no principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer em indivíduos não fumantes <sup>(19)</sup>.

Os mecanismos conhecidos hoje que conectam a obesidade com o risco aumentado de desenvolver câncer envolvem efeitos endócrinos e metabólicos e as consequentes alterações que induzem a produção de peptídeos e hormônios esteroides. Neste contexto, destacam-se a hiperinsulinemia crônica, alteração da secreção de hormônios esteroides sexuais e esteatoepatite não alcoólica <sup>(19)</sup>. A hiperinsulinemia crônica está associada com a patogênese do câncer de cólon e com os cânceres de mama, pâncreas e endométrio.

Em revisão recente a agência internacional para pesquisa em câncer (IARC) concluiu que evitar o aumento de peso reduziu o risco de desenvolver neoplasias malignas de cólon, mama, endométrio, rim e esôfago <sup>(20)</sup>.

Kitahara e cols. em 2011 <sup>(21)</sup> associaram elevados índices de incidência de câncer tireoidiano a uma possível elevação dos casos de obesidade, pontuando assim uma relação causal entre estes dois estados patológicos.

Mijovic e cols. em 2009 <sup>(22)</sup> concluíram que um alto IMC correlacionava-se com baixo risco para doenças malignas da tireoide, a não ser em pacientes do sexo feminino acima de 45 anos. Neste subgrupo observou-se uma alta taxa de malignidade em tireoide associada à presença de obesidade. Se existe alguma observação a ser feita, porém é de que estas conclusões foram baseadas em estudos epidemiológicos de indivíduos com sobrepeso e obesos comparados a indivíduos magros e não em estudos de indivíduos que perderam peso.

### ***1.1.3. Marcadores inflamatórios na obesidade***

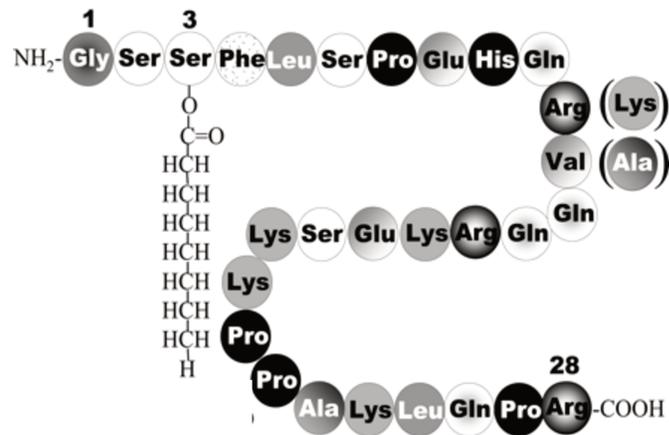
Muitos marcadores inflamatórios associados ao estado de obesidade tem sido descritos, sendo os mais relevantes e constituintes do chamado “brain-gut peptide system” a leptina, a adiponectina, a obestatina e seu contrarregulador, a grelina <sup>(23)</sup>.

#### ***1.1.4. O peptídeo grelina***

A grelina é um aminoácido de 28kd derivado da clivagem de seu precursor (preprorelina) descoberta por Kojima e cols. em 1999 <sup>(24)</sup> durante estudos. Dito “hormônio da fome” e fazendo parte do chamado “brain-gut signaling” (via de sinalização que envolve as interações entre o trato gastrointestinal e o cérebro), é secretada primariamente pelas células epiteliais endócrinas do fundo gástrico, e produzida também pelas células *epsilon* pancreáticas e do hipotálamo, com efeito predominantemente orexígeno, mas também com ação estimulante potente na secreção de hormônio do crescimento (GH) na pituitária anterior, de onde deriva seu nome original no inglês (*GH relin*). Sua secreção diminui com a alimentação <sup>(25)</sup>. Apesar da descoberta pelos asiáticos, cientistas britânicos posteriormente associaram este hormônio à sensação de fome. Ela também tem um papel importante no aprendizado, na memória e na adaptação a novos ambientes <sup>(26)</sup>. Indivíduos magros secretam grandes quantidades de grelina enquanto dormem, já esse fenômeno não é verificado nos obesos. O gene da grelina está localizado no cromossomo 3 e possui uma sequência de quatro exons e três introns <sup>(27)</sup>.

**FIGURA 1.** Sequência de aminoácidos da grelina humana. Notar a modificação do resíduo serina na posição 3 e 2 trocas de aminoácidos nas posições 11 e 12 que a diferem da grelina do rato. Retirado de <http://physiologyonline.physiology.org/content/18/6/242/F1.expansion.html>

### Grelina Humana (28kd)



A secreção de grelina em pacientes obesos mórbidos é menor do que em pessoas com peso ideal, porém estes apresentam maior sensibilidade ao hormônio,

bem como um mecanismo intrínseco que reduz sua produção quando o indivíduo aumenta seu peso <sup>(28)</sup>.

Sua relação com a obestatina é muito próxima, porém partilhando efeitos contrários; esta é um hormônio intimamente relacionado à ação da grelina descrita em 2005, sendo ambos codificados pelo mesmo gene, cujo produto é clivado em duas formas peptídicas distintas. O significado fisiológico deste evento ainda é desconhecido <sup>(29)</sup>.

#### ***1.1.5. Grelina em condições patológicas***

Já se sabe que o RNA mensageiro (mRNA) da grelina está constitucionalmente expresso em vários tecidos do corpo humano, como hipotálamo, coração, rins, pâncreas e linfócitos, entre outros <sup>(30)</sup>. O fato de haver grelina em circulação em torno de 100 a 120 pmol/ml sugere também que ela seja secretada pelos vasos, de modo a circular por todo o organismo <sup>(31)</sup>.

Apesar de seu principal efeito sobre a liberação de GH existem evidências recentes de uma série de efeitos nos mais diferentes órgãos e sistemas, incluindo o eixo hipotálamo-hipofisário, agindo na estimulação do apetite, influência no ritmo circadiano, controle da motilidade gástrica, entre outros. Sabe-se que exibe também ações relevantes na indução da adiposidade, sistema imunológico e sobre células neoplásicas <sup>(32)</sup>. Com este amplo espectro de descobertas da atividade biológica da grelina, novas perspectivas abrem-se em pesquisa neuroendócrina e oncológica, bem como em outras áreas do conhecimento.

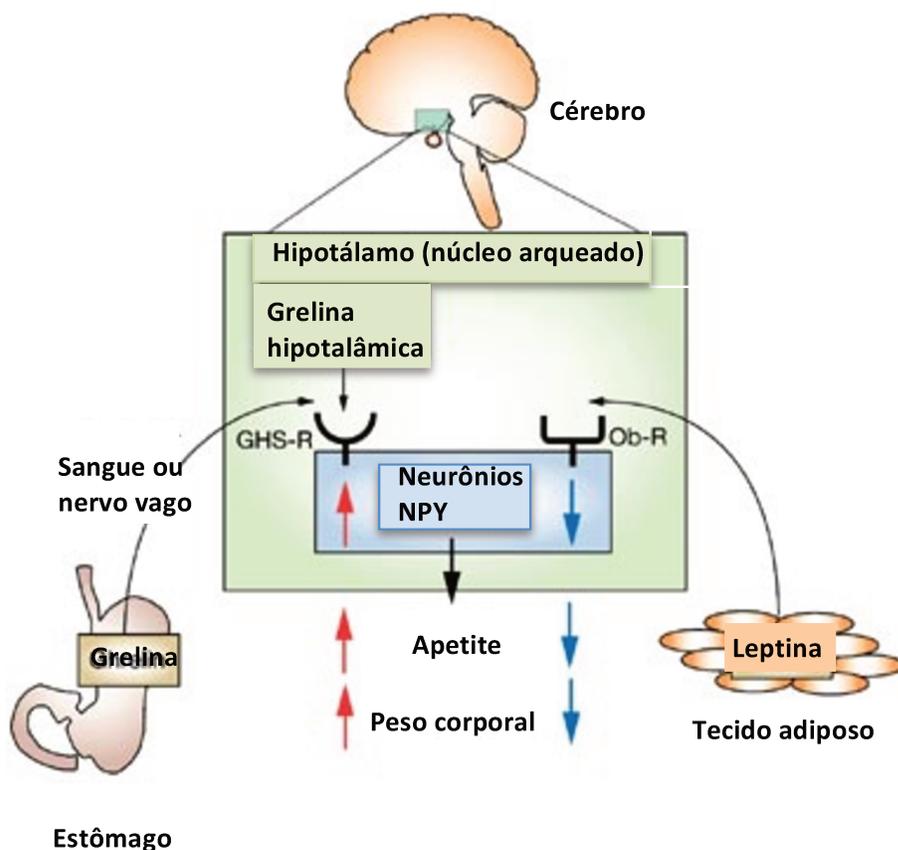
Existe alguma evidência sobre o papel deste peptídeo na liberação de GH; a infusão de GHRH (hormônio liberador da grelina) em estudos experimentais levou a um aumento na expressão de seu RNAm, bem como decréscimo em sua produção com a queda dos níveis do peptídeo, sugerindo que sua expressão no hipotálamo seja GHRH-dependente; sabe-se também que a secreção de grelina basal difere entre os sexos, sendo maior em mulheres na fase pós-folicular do ciclo menstrual <sup>(33)</sup>, o que poderia explicar diferenças na secreção de GH entre os sexos <sup>(34)</sup>. Níveis de grelina estão diminuídos na acromegalia, doença em que claramente há elevação dos níveis basais de GH, sugerindo assim um mecanismo de *feedback*. A mesma está também expressa em muitos adenomas hipofisários, reforçando que o desenvolvimento de suas células possa se dar por via autócrina ou parácrina.

A grelina hoje é conhecida como um dos mais poderosos orexígenos presentes em mamíferos, estimulando o apetite e aumentando a ingestão alimentar quando injetado em humanos <sup>(35)</sup>; sabe-se que sua atividade funciona como um sinal orexígeno para o cérebro, com seus níveis aumentando progressivamente com a alimentação e decaindo para um nível basal mínimo (nadir) dentro de uma hora pós-alimentação. Tem sua expressão aumentada em condições de balanço negativo de energia e diminuída em situações de grande utilização de energia, e é negativamente correlacionada com IMC, gordura corporal, tamanho dos adipócitos, níveis séricos de glicemia, insulina e leptina. Seu efeito parece ser o oposto do desta última, estando seus níveis diminuídos na obesidade, o que indica possivelmente uma adaptação fisiológica ao balanço energético positivo; por outro lado, níveis de

grelina em pacientes com bulimia nervosa estão elevados comparados a indivíduos saudáveis, possivelmente relacionando-se a um estado de hiperfagia destes pacientes; nestes também houve correlação negativa em relação à gordura corporal e IMC.

Atualmente credita-se à grelina um papel-chave nos distúrbios de amenorreia em mulheres esportistas de alto rendimento, bem como em outras síndromes anovulatórias aqui citadas, como os ovários policísticos<sup>(36, 37)</sup>.

**FIGURA 2.** Fisiologia da regulação do apetite pelos peptídeos leptina e grelina. Notar a estreita correlação entre grelina (secretada pelas células endócrinas do fundo gástrico) e leptina (secretada no tecido adiposo), com efeitos opostos (orexígeno e anorexígeno, respectivamente). Extraído de nature.com ([http://www.nature.com/nrendo/journal/v2/n2/fig\\_tab/ncpendmet0080\\_F3.html](http://www.nature.com/nrendo/journal/v2/n2/fig_tab/ncpendmet0080_F3.html))



Ainda é controversa a influência da grelina na secreção da insulina; enquanto alguns estudos sugerem uma associação negativa entre ambas, outros mostram que baixos níveis estão associados à resistência a este hormônio, dentre outros fenômenos <sup>(38)</sup>.

Níveis elevados de grelina foram encontrados em hepatopatas crônicos quando comparados a indivíduos saudáveis, não se correlacionando com seu grau de

disfunção hepática; em pacientes com hepatocarcinoma, os níveis apresentados são inversamente proporcionais aos de alfafetoproteína (AFP). Seu papel na síndrome de caquexia associada a estes casos ainda não é clara <sup>(39)</sup>.

Em portadores de insuficiência renal crônica (IRC), níveis de grelina estão aumentados e correlacionam-se com gordura corporal, insulina e leptina plasmáticas e novamente, são inversamente proporcionais ao IMC e às taxas de filtração glomerular.

#### ***1.1.6. Grelina e estados de disfunção tireoidiana***

Sabe-se hoje que as alterações tireoidianas podem sofrer influência da grelina, que age principalmente modulando funções das células foliculares. Estudos em ratos sugerem uma possível ação parácrina com papel conservador na manutenção das funções <sup>(40)</sup>. No ano de 2003 este marcador foi identificado em células derivadas de carcinoma medular da tireoide, porém até então desconheciam-se dados sobre sua possível expressão em células da linhagem folicular, agora demonstradas <sup>(41)</sup>. Estudos em tireoides fetais demonstraram forte imunorreatividade para grelina, e seu mRNA e a proteína final de seu metabolismo foram encontrados tanto em tumores benignos quanto em malignos <sup>(40)</sup>. Este mesmo estudo sugeriu em pesquisa que tireoides de crianças na primeira infância e adultos não possuiriam imunorreatividade, que voltaria a se expressar na fase adulta nos tecidos tumorais benignos ou malignos, sugerindo, portanto, uma possível autonomia na re-expressão de grelina por estas células neoplásicas <sup>(40)</sup>, na tentativa de inibir a proliferação

destas *in vitro*, ou ainda a presença de receptores grelina-específicos que não o de grelina em si (*GHS-R*).

Níveis de grelina e obestatina estão diminuídos nos estados de hipertireoidismo, sugerindo que a hiperfagia destes estados patológicos não seja diretamente modulada por sua ação <sup>(41-43)</sup>; porém, outros estudos sugerem um possível feedback negativo entre os níveis elevados de tiroxina (T4) por possível ação direta de grelina <sup>(44)</sup>. Por outro lado, são observados altos níveis de grelina plasmática em pacientes hipotireoideos, sendo que esta alteração se corrige com a administração rotineira de T4; ainda não se sabe se isto é um efeito direto da reposição de tiroxina ou se é um estímulo compensatório às baixas taxas metabólicas basais observadas nestes pacientes <sup>(45)</sup>. Embora a leptina pareça ser o hormônio principalmente envolvido nos efeitos tireoidianos na manutenção da homeostase, a grelina e outros hormônios do ciclo fome-saciedade, como a adiponectina e a obestatina, parecem ter um papel compensatório, principalmente no hipotireoidismo <sup>(46)</sup>. Parece que, de modo a ser elucidado, nestes casos há efeito dos níveis de grelina sérica mediado pela ação dos baixos níveis de hormônios tireoidianos circulantes, bem como dos autoanticorpos presentes. Os níveis de triiodotironina (T3) livre foram demonstrados como os preditores mais relevantes, apresentando relação direta com os níveis de grelina circulantes <sup>(47)</sup>.

### ***1.1.7. Grelina e proliferação celular na célula tireoidiana***

Sabe-se de modo geral que a grelina regula proliferação celular via *GHS-R*. Alguns achados sugerem que a grelina não somente estimula a proliferação de células *FTR5* tireoidianas, mas aumenta seus efeitos por *feedback* com o hormônio tireoestimulante (TSH); sua administração exógena potencia efeitos de crescimento da grelina de células tireoidianas <sup>(48)</sup>.

Um estudo recente demonstrou que células de carcinomas papilíferos tem sua expressão de grelina diminuída, mas não de obestatina <sup>(49)</sup>.

Zhang e cols.em 2006 <sup>(50)</sup> coraram vários espécimes teciduais de tireoide e analisou a expressão de grelina por imunistoquímica, observando forte e difusa expressão nos tecidos malignos e ausência de expressão nos benignos ou doenças inflamatórias, sendo este achado ainda carente de explicações adicionais e com significado controverso.

### ***1.1.8. Importância do rastreamento de câncer nos nódulos da tireoide***

Embora o câncer de tireoide seja relativamente raro, na prática clínica encontramos frequentemente portadores de nódulos. Cerca de 5 a 7% da população tem nódulos clinicamente detectáveis à simples palpação cervical, o que significa cinco mil a sete mil nódulos para cada 100000 habitantes. O uso cada vez mais frequente da ultrassonografia cervical vem aumentando sensivelmente esta prevalência já agravada pelo envelhecimento populacional, de modo que a incidência de nódulos atinge a percentagem de 67% de algumas populações <sup>(51)</sup>.

Portanto, observamos cada vez mais a necessidade de métodos eficazes e baratos para rastrear malignidade entre os muitos casos benignos examinados na rotina.

Os carcinomas diferenciados da tireoide (CDT) correspondem a 80 a 90% dos tumores tireoidianos <sup>(52-54)</sup> e possuem excelente prognóstico, embora alguns casos possam evoluir com recidiva precoce e mau prognóstico. <sup>(55)</sup> Apesar do grande número de estudos a respeito, ainda é bastante controversa a correlação entre a apresentação clínica inicial dos pacientes e o seu prognóstico. O que se observa é que tumores histologicamente semelhantes, com estádios próximos e, portanto, recebendo tratamento semelhante, algumas vezes evoluem de forma diversa no que diz respeito à recorrência e sobrevida <sup>(53)</sup>. A origem da variabilidade deste comportamento ainda é incerta. Os dados referentes ao tradicional sistema TNM, um sistema eminentemente clínico de estadiamento criado pela *Union for International Cancer Control* (UICC) <sup>(56)</sup>, não geram, na prática clínica, uma correlação prognóstica adequada. Por esta razão, há cerca de vinte anos vêm-se pesquisando possíveis marcadores moleculares tumorais. No mesmo período, ganhou força a tendência da pesquisa tecidual (utilizando o próprio tumor coletado a fresco) para pesquisa das variabilidades do genoma (polimorfismos, mutações) e suas possíveis associações com a ocorrência de neoplasia, ou pesquisando-se a ocorrência e quantificação de substâncias que sejam possíveis marcadores teciduais (como RNA mensageiro e proteínas sinalizadoras) e que possam servir como marcadores diagnósticos e/ou prognósticos para neoplasias (alguns destes marcadores com

aplicabilidade em mais de uma neoplasia).

Nos últimos anos a literatura tem voltado sua atenção ao subgrupo dos microcarcinomas, definidos pela OMS como nódulos tireoidianos com tamanhos menores ou iguais a 10mm de diâmetro <sup>(57)</sup>. Estes possuem epidemiologia distinta dos carcinomas dito clínicos <sup>(58)</sup>, com características patológicas e imunológicas específicas relacionadas à não-progressão tumoral <sup>(59, 60)</sup>. Questiona-se atualmente se existiriam características moleculares específicas relacionadas a esta ocorrência (por exemplo, encapsulamento), porém a resposta a esta dúvida atualmente ainda é controversa.

Em 2006, Davies e cols.<sup>(3)</sup> demonstraram que o aumento de incidência observado na atualidade se deve principalmente a esta entidade, demonstrando assim a grande importância dos microcarcinomas na epidemiologia do câncer bem diferenciado da tireoide nos últimos quinze a vinte anos; apesar desta incidência crescente porém, temos observado a manutenção das taxas de mortalidade associadas a estes casos, criando assim uma janela de oportunidade para estudo desta população específica, no que diz respeito tanto aos aspectos clínicos quanto moleculares que produziram tal situação epidemiológica.

Em 2011, Hughes e cols.<sup>(61)</sup> observaram que, nos últimos quinze anos, houve incremento no número de casos de CDT menores de 10mm diagnosticados, notando tendência exatamente oposta para os ditos carcinomas clínicos, com decréscimo no número de casos para os tumores maiores de 10mm, em todas as faixas etárias. A

literatura de modo geral tem apresentado muitas controvérsias a respeito desta entidade em particular, demonstrando prevalências para microcarcinomas muito variáveis em várias séries de casos, podendo chegar a até 50% em espécimes de autopsias <sup>(62)</sup> sem necessariamente haver manifestação clínica de sua ocorrência, demonstrando a natureza muitas vezes indolente deste tipo de neoplasia. Por outro lado, trabalhos japoneses demonstram em grandes casuísticas nas quais há de fato uma drástica diminuição do tempo de sobrevida livre de doença com o avançar da idade para estes tumores, ratificando a importância deste parâmetro como fator prognóstico independente para este subgrupo, que ao final se comportaria exatamente como o grande grupo dos tumores ditos clínicos <sup>(63, 64)</sup>.

A presença de características do próprio tumor como a invasão extracapsular <sup>(64)</sup> e o aumento do volume tumoral notado em estudos observacionais <sup>(65)</sup> influenciaram a sobrevida livre de doença; em outros estudos observacionais notou-se que, ao seguimento ultrassonográfico, houve até mesmo um decréscimo no tamanho do tumor, revelando assim um padrão de comportamento incerto para esta entidade, ao menos no que tange à população asiática, porém levantando questionamentos quanto às particularidades deste subgrupo em particular <sup>(66)</sup>.

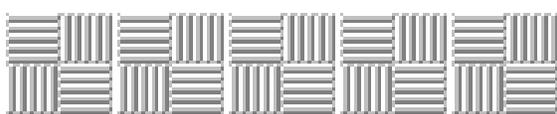
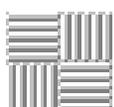
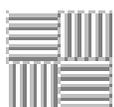
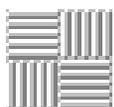
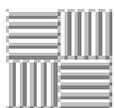
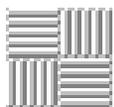
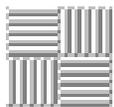
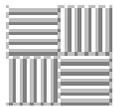
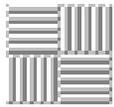
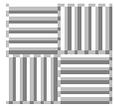
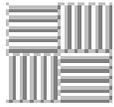
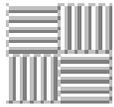
Ramos e cols. em 2009 <sup>(67)</sup> demonstraram que, em certas regiões com particularidades geográficas, pacientes com tumores ressecados e estudados histologicamente seguidos por um determinado período de tempo, apresentam características específicas relacionadas à evolução da doença, como a ausência de fibrose peritumoral que impediria, ao menos em tese, a progressão do tumor e a

evolução para a variante clínica, enquanto tumores encapsulados apresentavam aspectos mais benignos em sua evolução, como menor taxa de recidivas e maior sobrevida livre de doença dentre outros fatores.

Em estudo ainda mais recente, Kim e cols.<sup>(68)</sup> demonstraram análises de perfis de expressão em grandes amostragens pela técnica de *microarray*, comparando tecido tireoidiano normal e tumoral para carcinomas clínicos e microcarcinomas, não demonstraram diferenças quanto ao perfil genético para estas duas entidades.

Após todas estas evidências, permanece ainda incerto o comportamento clínico-evolutivo para os microcarcinomas em particular, com evolução e prognóstico ainda variável e que depende de mais fatores a serem estudados para elucidação de seu comportamento distinto dos tumores maiores de um centímetro observado em algumas casuísticas<sup>(60)</sup>. Certamente não apenas seu tamanho contribui para este aspecto, sendo inúmeras as variáveis que podem compor este quadro, desde a variante histológica até mesmo fatores do próprio indivíduo externas ao tumor, o que reforça a necessidade de estudo de marcadores tumorais para este grupo particular que, uma vez presentes, não só diagnosticariam a ocorrência de câncer precocemente nestes pequenos nódulos como poderia predizer sua agressividade e determinar a individualização do tratamento.

Baseando-se nisto, formularam-se as seguintes hipóteses:



## II. Hipóteses

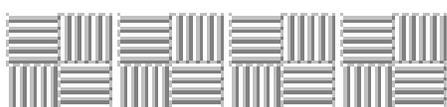
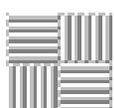
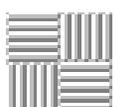
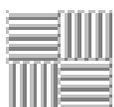
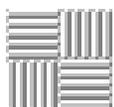
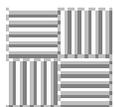
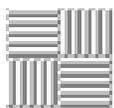
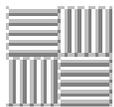
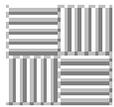
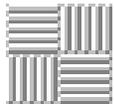
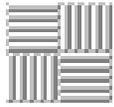
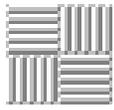
## II. HIPÓTESES

---

É possível que determinados níveis séricos de grelina circulante e/ou sua expressão em tecido tireoidiano tumoral (benigno e maligno) possam influenciar a etiopatogenia e o comportamento das doenças nodulares tireoidianas, bem como auxiliar na identificação de indivíduos de risco para malignidade dentre os portadores, particularmente os obesos (que partilham deste estado pró-inflamatório predisponente ao risco).

Portanto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1) Poderiam os níveis séricos de grelina pré-operatórios de pacientes portadores de CDT e microcarcinoma auxiliar na identificação de indivíduos com aspectos mais agressivos e de pior prognóstico?
- 2) Estes marcadores podem ser auxiliares na identificação de malignidade para microcarcinomas?
- 3) A expressão imunoistoquímica de grelina apresentada nos espécimes cirúrgicos da casuística poderia auxiliar no diagnóstico de malignidade dentre os nódulos?



### III. Objetivos

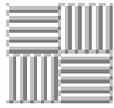
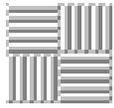
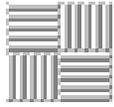
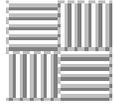
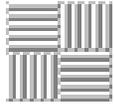
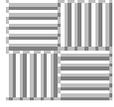
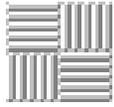
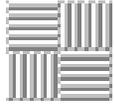
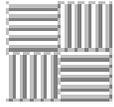
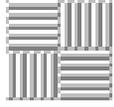
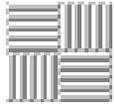
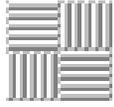
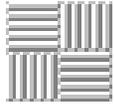
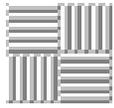
### III. OBJETIVOS

---

- Correlacionar os diferentes níveis séricos de grelina do soro de pacientes selecionados para estudo das concentrações séricas, de modo a verificar correlação com os aspectos clínicos coletados dos mesmos pacientes portadores de nódulos neoplásicos (benignos e malignos);

- Avaliar a expressão tecidual por imunistoquímica para observar se há diferenças na expressão deste marcador nestes espécimes e verificar se esta expressão possui poder discriminatório para malignidade;

- Especificar esta análise para o subgrupo de pior prognóstico no intuito de se verificar possível poder de agressividade tumoral observando as variáveis clínicas indicativas de pior prognóstico para este subgrupo específico.



## IV. Sujeitos e Métodos

## **IV. SUJEITOS E MÉTODOS**

---

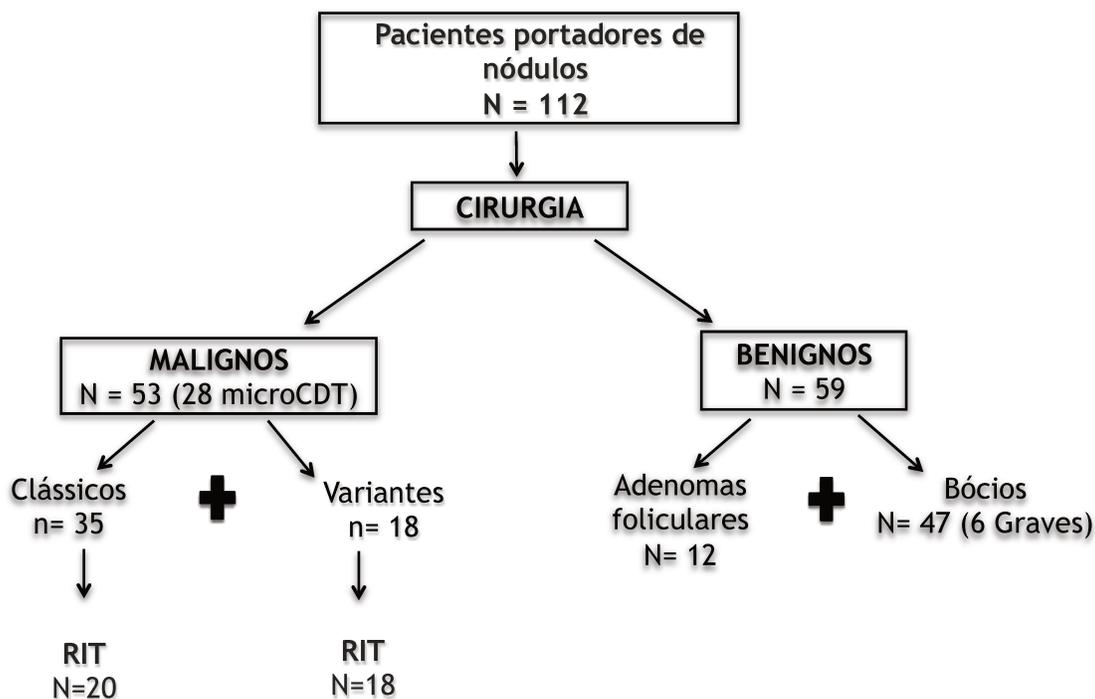
### ***IV.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES PARA A DOSAGEM SÉRICA DE GRELINA***

Este estudo prospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e registrado no CONEP (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa) sob o número 16582013.4.0000.5404, sendo esta linha de pesquisa inclusa em projeto FAPESP regular sob o número 2011/21582-2. Todos os pacientes ou responsáveis pelos mesmos forneceram seu espécime para estudo sob consentimento informado, após explanação concisa sob o tratamento a ser individualmente aplicado (ver anexos).

#### ***IV.1.1. Critérios De Inclusão e Exclusão***

Foram considerados elegíveis para estudo 117 pacientes portadores de nódulos neoplásicos tireodíanos, benignos e malignos, candidatos à cirurgia de tireoide. Destes, foram excluídos os pacientes que não aceitaram participar do estudo em questão, bem como os que não apresentavam todos os dados clínicos necessários à correlação estatística desejada. Houve ainda a exclusão de casos em que houve inadequação e/ou perdas durante o processamento do espécime, totalizando a exclusão de cinco casos, restando para o estudo 112 doentes.

**FIGURA 3.** Distribuição dos 112 pacientes da casuística demonstrando os diagnósticos histológicos a amostragem final considerada para estudo



#### *IV.1.2. Dos Pacientes Seleccionados – coleta de dados clínicos e histopatológicos*

Foram então selecionados para o estudo sérico de grelina e a demonstração de sua imuno-reatividade em neoplasias de tireoide 53 pacientes portadores de carcinomas papilíferos e 59 portadores de doenças benignas variadas (bócios, hiperplasias, tireoidites e adenomas); foram utilizadas amostras retiradas de espécimes cirúrgicos coletados em procedimentos realizados por uma mesma equipe e acompanhados por um mesmo examinador.

Estes pacientes tiveram suas medidas clínicas e antropométricas (IMC, porcentagem de gordura corporal, gênero, etnia, antecedente familiar para tireoidopatias dentre outros) e características pós-operatórias relacionadas ao tumor (tamanho do nódulo, ocorrência de multifocalidade ao diagnóstico, metástases, estadiamento TNM e presença de autoanticorpos que sugerissem tireoidite, por exemplo) coletadas dos prontuários, de modo que servissem como variáveis para possível estratificação de risco associável ao diagnóstico histopatológico final.

A mensuração de peso foi realizada através de balança marca Plenna® com divisão de 100 gramas, com os indivíduos sem sapatos (a mesma utilizada para cálculos de bioimpedanciometria). A altura foi medida utilizando estadiômetro conectado à balança com divisão de um centímetro. O IMC foi calculado pela divisão do peso (em quilos) pela altura (em metros) ao quadrado. A classificação do grau de obesidade foi realizado de acordo com os parâmetros da recomendação da OMS.

## **IV.2. DESCRITIVA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO**

Na população estudada, tivemos 30 (26,7%) pacientes considerados obesos e 72 (64,3%) não obesos.

## **IV.2.1. DOS PORTADORES DE NÓDULOS MALIGNOS**

### ***IV.2.1.1. Sexo***

Vinte e um dos 112 pacientes (18,7%) eram do sexo masculino. O sexo feminino foi predominante com 91 pacientes (81,3%).

### ***IV.2.1.2. Idade***

A idade da população variou entre 18 a 67 anos, sendo a média  $29 \pm 1,7$  anos para o sexo masculino e  $32,9 \pm 1,2$  anos para o feminino.

### ***IV.2.1.3. Estádio Clínico TNM ao Diagnóstico***

Dos cinquenta e três pacientes portadores de tumores malignos, quarenta e dois (79,2%) foram classificados como estágio I pelo TNM (sendo 28 (52,8%) correspondentes a microcarcinomas), dois (3,8%) como estágio II, sete (13,2%) como estágio III e dois (3,8%) como estágio IV.

## **IV.2.2. DAS LESÕES BENIGNAS**

Dos cinquenta e nove pacientes, 33 eram do sexo masculino e 26 do sexo feminino. Deste total, seis (10,2%) eram compatíveis com doença de Graves ou tireoidite de Hashimoto, três eram adenomas foliculares (5%), um correspondia a um cisto em tireoide (1,6%) e o restante (83,2%) a bóciós únicos ou multinodulares.

### **IV.3. MÉTODOS**

---

#### ***IV.3.1. COLETA DE SANGUE PARA A DOSAGEM SÉRICA DE GRELINA***

Dosagens séricas e tecido tumoral para estudo de grelina foram obtidas no período intra-operatório pela própria equipe cirúrgica, após coleta de sangue periférico por venopunção jugular durante as tireoidectomias, sendo o sangue encaminhado ao laboratório para centrifugação e armazenagem do plasma sempre no mesmo dia da coleta; o tecido a fresco foi emblocado, adequadamente identificado e vedado, para posterior processamento.

#### ***IV.3.2. ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)***

A técnica de *ELISA* baseia-se na interação anticorpo-antígeno e foi a escolhida. Esta interação produz uma fluorescência quando na presença de um substrato, fazendo com que seja possível que o leitor capte a quantidade de coloração emitida e, assim, consiga quantificar a proteína desejada.

As dosagens de grelina foram realizadas no Laboratório Limed, no Gastrocentro da UNICAMP. As concentrações plasmáticas foram determinadas através do método colorimétrico, seguindo as especificações correspondentes ao kit *R&D System®*. Todos os reagentes necessários para a realização das dosagens foram deixados em temperatura ambiente antes de usá-los.

**FIGURA 4.** Resultado visual da técnica de *ELISA* para ilustração, demonstrando a imuno-reatividade final em alguns poços da placa após a sequência de ensaio (em amarelo). Retirado de [www.virology-online.com](http://www.virology-online.com).



#### ***IV.3.2.1 Protocolo Geral***

O protocolo geral para *ELISA* foi muito similar ao padronizado para todas as proteínas, sem grandes variações. Para grelina foram utilizados kits *Duo Set®*, necessitando de preparação da placa para adsorção do anticorpo. Os passos utilizados estão a seguir:

##### ***IV.3.2.1.1. Preparação do plaqueamento:***

Inicialmente, foi diluído o anticorpo de captura para concentração de trabalho em solução salina (*phosphate buffered saline, PBS*) sem proteína carreadora,

cobrindo os 96 poços da placa imediatamente com 100  $\mu\text{L}$  por poço do anticorpo de captura diluído, selando-se a placa e submetendo-a a incubação *overnight* em temperatura ambiente. Posteriormente cada poço da placa foi aspirado e lavado com tampão de lavagem, repetindo-se esse processo duas vezes até o total de três lavagens. Em seguida a placa foi lavada preenchendo cada poço com tampão de lavagem (400 $\mu\text{L}$ ). Após a última lavagem inverteu-se a placa absorvendo os resíduos em papel toalha. Depois o processo de lavagem, as placas foram bloqueadas adicionando-se 300 $\mu\text{L}$  de tampão em cada poço, havendo nova incubação em temperatura ambiente por uma hora. Passada esta hora foi repetido o processo de aspiração e lavagem da placa.

#### ***IV.3.2.1.2. Ensaio:***

Foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  das amostras ao diluente apropriado por poço, cobrindo-se com filme plástico e incubando o espécime por duas horas em temperatura ambiente. Após esta etapa a placa foi aspirada e lavada novamente. Foram então adicionados 100 $\mu\text{L}$  de substrato em cada poço, aguardando por 20 minutos. Posteriormente, 50 $\mu\text{L}$  de solução *stop* foi adicionada em cada poço e a placa foi levemente movimentada para garantir a mixagem, após o que foi determinada a densidade óptica de cada poço utilizando o leitor de microplaca.

### **IV.3.3. IMUNOISTOQUÍMICA**

A técnica de imunohistoquímica convencional foi realizada em cortes de 30 emblocados em parafina benignos e malignos separados ao acaso dentre as neoplasias da casuística para análise complementar que evidenciasse a expressão da grelina nos diferentes tecidos, utilizando-se reação antígeno-anticorpo para grelina com espécime previamente adquirido para esta finalidade; a verificação de presença ou ausência de imuno-reatividade foi feita de acordo com o método convencional por campo de aumento para o marcador estudado, com posterior comparação com o diagnóstico histológico, de modo a gerar pequena descritiva que possa orientar estudos posteriores .

Para as reações, secções de tecido de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram deparafinizadas em xileno e desidratadas com doses seriadas de etanol a gradação crescente. Atividade endógena da peroxidase e ligações não específicas foram abolidas com o uso de peróxido de hidrogênio a 0,3% em solução de metanol por quinze minutos. Após lavagem em solução salina fosfatada a pH 7.2 (*PBS*), anticorpo bovino a 10% foi aplicado por 20 minutos para bloquear reações inespecíficas. Os fragmentos foram então encubados “*overnight*” a 4°C após a colocação do anticorpo específico diluído a 1:100 (*Rabbit Anti-Human Ghrelin Polyclonal Antibody, Unconjugated from Abcam - Applications Immunohistochemistry-P, Western Blot, 100uL, Millipore®*). Após lavagem em *PBS* foram tratados com imunoglobulina antiovelho marcada com peroxidase a 0,01% (*Nichirei, Tokyo, Japan®*) por 30 minutos. A reação foi visualizada encubando-se os fragmentos em solução tampão de

tetrahydroclorito de diaminobenzidina 0.05 M com peroxidase, e então estes foram corados com hematoxilina. Controles negativos foram obtidos substituindo-se o anticorpo primário com solução salina tamponada.

#### ***IV.3.4. CIRURGIA E SEGUIMENTO DOS 112 DOENTES***

##### ***IV.3.4.1. Cirurgia***

Todos os pacientes portadores de nódulos benignos e malignos foram submetidos a procedimento cirúrgico para tratamento e tiveram seus espécimes coletados para análise histopatológica e molecular. A tireoidectomia total foi o procedimento padrão para os casos de neoplasia maligna, sendo também realizada nos tumores benignos quando havia nódulos múltiplos pelo parênquima detectados inicialmente pelo exame clínico e ultrassonográfico.

Em oito pacientes (15%) portadores de carcinoma papilífero houve, além da tireoidectomia total, a necessidade de esvaziamentos cervicais recorrentiais por conta dos linfonodos suspeitos detectados ao diagnóstico inicial, que se confirmaram positivos histologicamente. Tecido macroscopicamente normal foi marcado com fio de sutura cirúrgico na peça demonstrando a região coletada e esta, quando confirmada pelo patologista como ausente de tireoidite e/ou neoplasias, era armazenada para possíveis análises posteriores do emblocado em parafina.

#### ***IV.3.4.2. Seguimento dos pacientes com câncer***

A tiroglobulina foi o marcador sérico utilizado para o seguimento pós-operatório dos pacientes com carcinoma papilífero e foi considerada em níveis adequados em 48 (90,5%) dos pacientes durante o seguimento (abaixo de 0,2 ng/mL pelo método ultrasensível). Os pacientes considerados de alto risco foram submetidos à ablação de remanescentes com dosagens padronizadas em, no mínimo, 100 mCi, e após o tratamento adjuvante os pacientes foram seguidos periodicamente com pesquisas de corpo inteiro (PCI) e novas medidas de tiroglobulina periódicas, de acordo com protocolos nacionais e internacionais de seguimento <sup>(69-71)</sup>. Estes incluíam raios-X de tórax, ultrassonografia cervical e de outras regiões anatômicas caso houvesse suspeita de acometimento destes sítios. O tempo de seguimento foi de 10 a 216 meses ( $82,28 \pm 43,85$  meses). Pacientes com altos níveis de tiroglobulina e/ou PCI suspeitas para envolvimento metastático à distância foram submetidos a outros exames de imagem, incluindo a tomografia computadorizada se necessário, para verificar possível recorrência da doença. Os pacientes com recidivas localizadas e tratadas, a despeito de novos níveis normalizados de tiroglobulina pós-tratamento da recorrência, foram considerados de mau prognóstico, e os pacientes restantes livres de progressão foram considerados de boa evolução e prognóstico.

#### ***IV.3.4.3. Análise Estatística***

Foram aplicados testes de correlação diagnóstica dentro dos parâmetros internacionais para verificar associação dos achados clínicos ao momento do diagnóstico com os achados histopatológicos, de modo a tentar indentificar na grelina um possível marcador para malignidade.

O software SAS/STAT (*Statistical Analysis System*®) versão 8.2 (Cary NC, USA, 1999-2001) foi utilizado para as análises estatísticas.

Uma curva ROC (*receiver operating characteristic*) foi construída plotando-se a sensibilidade (casos realmente positivos para neoplasia) no eixo Y e o da especificidade (proporção de falsos positivos, ou seja, os inicialmente suspeitos porém não confirmados, *1- spec*) no eixo X para diferentes pontos de corte relacionados à expressão de grelina. Sensibilidade, especificidade e valores preditivos foram calculados e o teste exato de Fisher foi utilizado para demonstrar a associação entre estes e o nível de significância da amostra. Gráficos *box plot* foram gerados baseados nestes valores de modo a tentar determinar associação entre estes níveis e poder discriminatório para malignidade.

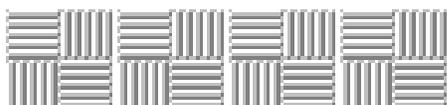
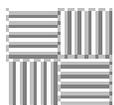
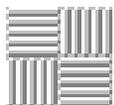
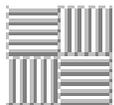
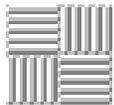
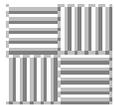
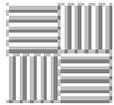
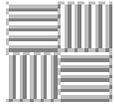
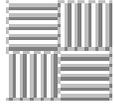
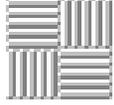
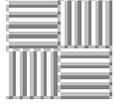
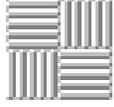
O teste qui-quadrado foi utilizado para a verificação de associação entre a expressão imunoistoquímica e risco para malignidade.

O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para verificar a significância estatística para as diferenças absolutas de expressão entre nódulos benignos e malignos da

amostra, entre carcinomas e microcarcinomas e entre os subgrupos obesos e não-obesos.

A força de associação do estudo e a probabilidade reportada para falsos positivos em relação aos valores séricos de grelina (*false-positive report probability, FPRP*) foi calculada segundo Wacholder e cols.<sup>(72)</sup>.

Todos os trabalhos foram conduzidos em nível de significância estatística de 5% e intervalo de confiança de 95% para demonstrar a força de correspondência entre as relações estudadas.



# V. Resultados

## **V. RESULTADOS**

---

### **V.1. Das Dosagens séricas (ELISA)**

V.1.1. Correlação com aspectos clínico-patológicos da casuística

V.1.2. Como marcador diagnóstico

V.1.3. Correlação com microCDT

V.1.4. Prognóstico

### **V.2. Expressão Tecidual (IHQ)**

V.2.1. Associação com aspectos clínicos

V.2.2. Discriminação de malignidade

---

## V.1. Das Dosagens séricas (ELISA)

---

### *V.1.1. Correlação das dosagens séricas com aspectos clínico-patológicos da casuística*

---

Característica	p
Sexo (F ou M)	0,9322
Idade (> ou ≤ 45a.)	0,9314
Etnia (B x NB)	0,3121
Paridade (0 ou ≥ 1)	0,0902
Tempo (82,28 ± 43,85 meses)	0,8027
AF tireoidopatias (+ ou -)	0,2523
IMC (≤ ou > 30)	0,388
Menarca	0,5976
Tamanho do nódulo (≤ ou > 10mm)	0,0642

*Qui quadrado, Mann-Whitney*

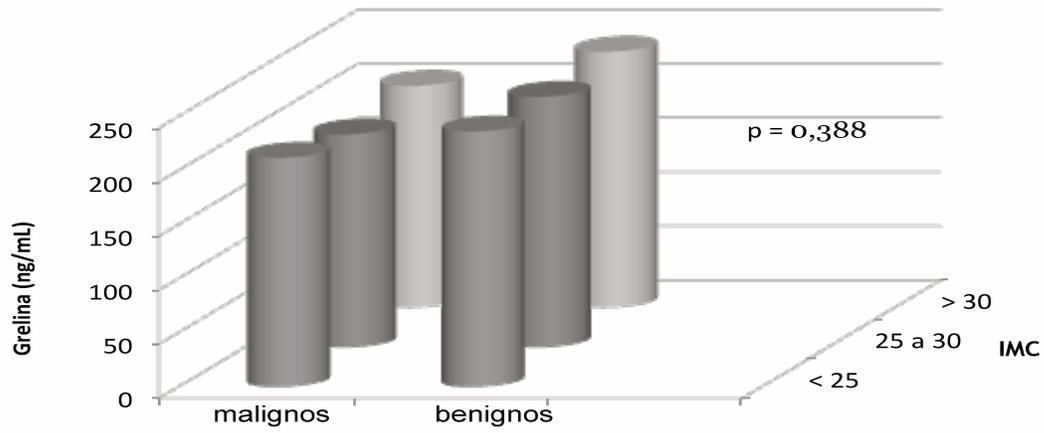
***V.1.2. TABELA 2 - Dosagens séricas de grelina x IMC para os 112  
pacientes estratificados por características clínicas***

---

<b>Característica</b>	<b>p</b>
<b>Sexo (F ou M)</b>	0,9322
<b>Idade (&gt; ou ≤ 45a.)</b>	0,9314
<b>Etnia (B x NB)</b>	0,3121
<b>Paridade (0 ou ≥ 1)</b>	0,0902
<b>Tempo (82,28 ± 43,85 meses)</b>	0,8027
<b>AF tireoidopatias (+ ou -)</b>	0,2523
<b>IMC (≤ ou &gt; 30)</b>	0,388
<b>Menarca</b>	0,5976
<b>Tamanho do nódulo (≤ ou &gt; 10mm)</b>	0,0642

*Qui quadrado, Mann-Whitney*

---



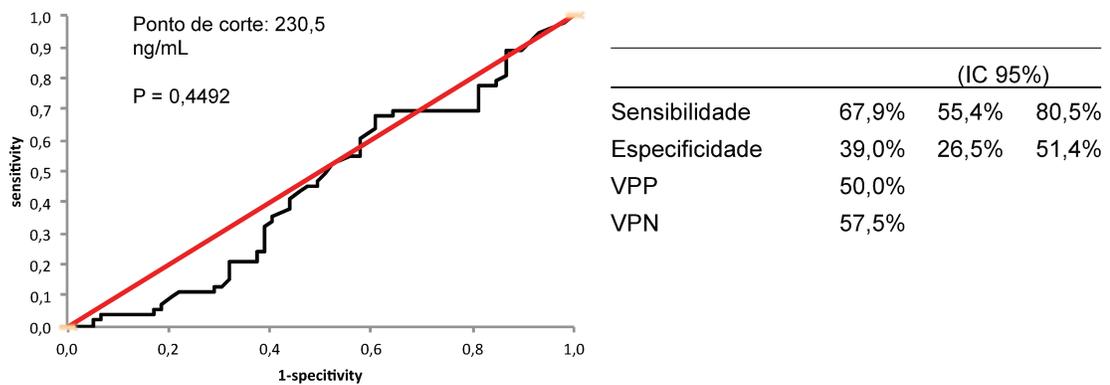
***V.1.2. GRAFICO 1. Dosagens séricas de grelina e sua correlação com o IMC dos pacientes como marcador diagnóstico para malignidade (p = NS)***

---

O resultado da curva ROC é demonstrado a seguir:

**GRÁFICO 2.** Curva ROC apresentando a distribuição dos 112 casos estudados para a dosagem sérica de grelina. Observa-se o melhor ponto de corte para a dosagem de 230,5 ng/mL, porém sem poder discriminatório para malignidade na amostra estudada ( $p = 0,4492$ ).

### Grelina (CDT x Benignos)



**TABELA 3.** Grelina sérica e risco para câncer

	BENIGNOS		MALIGNOS		Total	p	OR (CI 95%)		
	n	%	n	%					
	59		53						
<b>GRELINA</b>						0,4492			
≥230,5	36	61	36	68%	72				
<230,5	23	39	17	32%	40		1,23	(0,56	A 2,71)

$\pi$	$\alpha$	OR (IC 95%)	Poder	FPRP
0,47	0,05	1.23(0.56 a 2.71)	0,0820	0,06

Grelina (ng/mL)					
		Média	DP	Mediana	p
	112	206,48	57,93	235,1	
<b>BENIGNOS</b>	59	207,69	59,74	235,34	
<b>Adenomas</b>	12	209,35	62,83	238,52	
<b>Bócios</b>	41	192,27	63,29	231,72	<b>0,3576</b>
<b>Graves</b>	6	212,01	54,7	235,1	

**TABELA 4:** Dosagens séricas de grelina para os 53 nódulos malignos e variantes

		Grelina (ng/mL)			p
		Média	DP	Mediana	
<b>MALIGNOS</b>	53	205,14	56,38	234,86	
<b>clássicos</b>	35	205,38	58,57	234,86	<b>0,9322</b>
<b>variantes</b>	18	211,85	55,86	236,81	

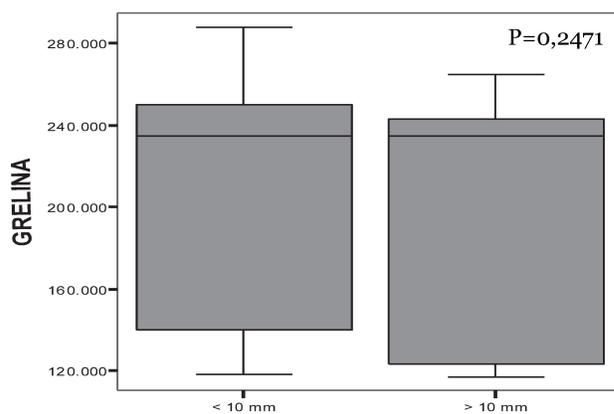
**TABELA 5:** Dosagens séricas de grelina para os 53 nódulos malignos e variáveis do tumor

Característica	p
<b>Tamanho do nódulo (&gt; ou ≤ 10mm)</b>	0,0642
<b>Multifocalidade (+ ou -)</b>	0,90087
<b>Invasão extracapsular (+ ou -)</b>	0,96369
<b>AntiTg +</b>	0,0907
<b>Metástase LN no AP (+ ou -)</b>	0,5526

*Mann-Whitney, Kruskal-Wallis*

**TABELA 6.** Análise das variáveis relativas á dosagens séricas de grelina para o grupo dos 28 microcarcinomas (microCDT) e aspectos histológicos do tumor (p=NS)

	< 10mm				≥ 10mm			
	N	Média	DP	Mediana	N	Média	DP	Mediana
GRELINA	28	234,9	31,7	237,3	25	199,0	58,4	235,4



*Mann Whitney, Kruskal-Wallis*

**GRÁFICO 3:** Dosagens séricas de grelina para os 28 microcarcinomas e variáveis clínicas (p=NS) – observar a ausência de significância no poder discriminatório quando comparado ao grupo carcinomas (≥ 10mm).

característica	p
Sexo (F ou M)	0,1648
Etnia (B x NB)	1,000
Tabagismo (sim/não)	0,1179
Antecedente familiar (+ ou -)	0,7756
Peso	0,49085
Reposição hormonal	0,7604
IMC (> ou ≤ 30 Kg/m <sup>2</sup> )	0,6107
Anticoncepcional (+ ou -)	0,381
Menopausa (sim/não)	0,7766

*Qui-quadrado, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis*

**TABELA 7:** Dosagens séricas de grelina para os 28 microcarcinomas e características clínicas dos pacientes (p=NS).

característica	p
Invasão Extracapsular (+ ou -)	0,9262
LN+ ao diagnóstico	0,9857
Estadiamento	0,307
Multifocalidade (+ ou -)	0,2684

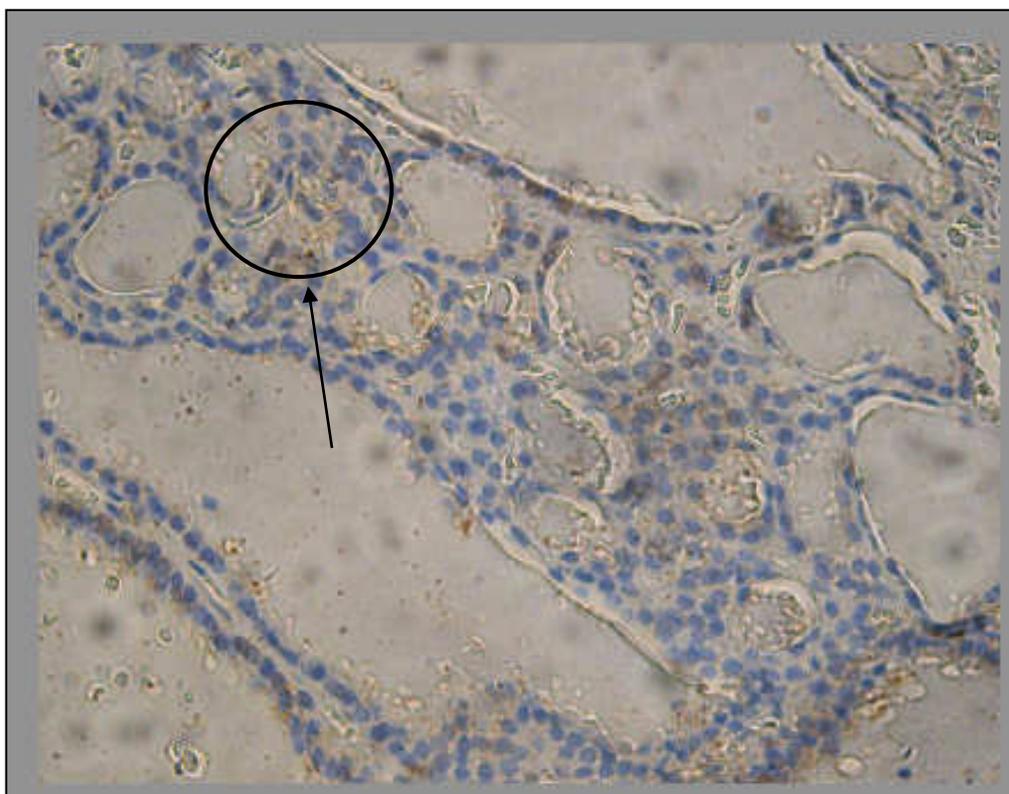
*Qui-quadrado, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis*

**TABELA 8.** Análise da dosagem sérica e discriminação de Características Histológicas dos Microcarcinomas (p=NS).

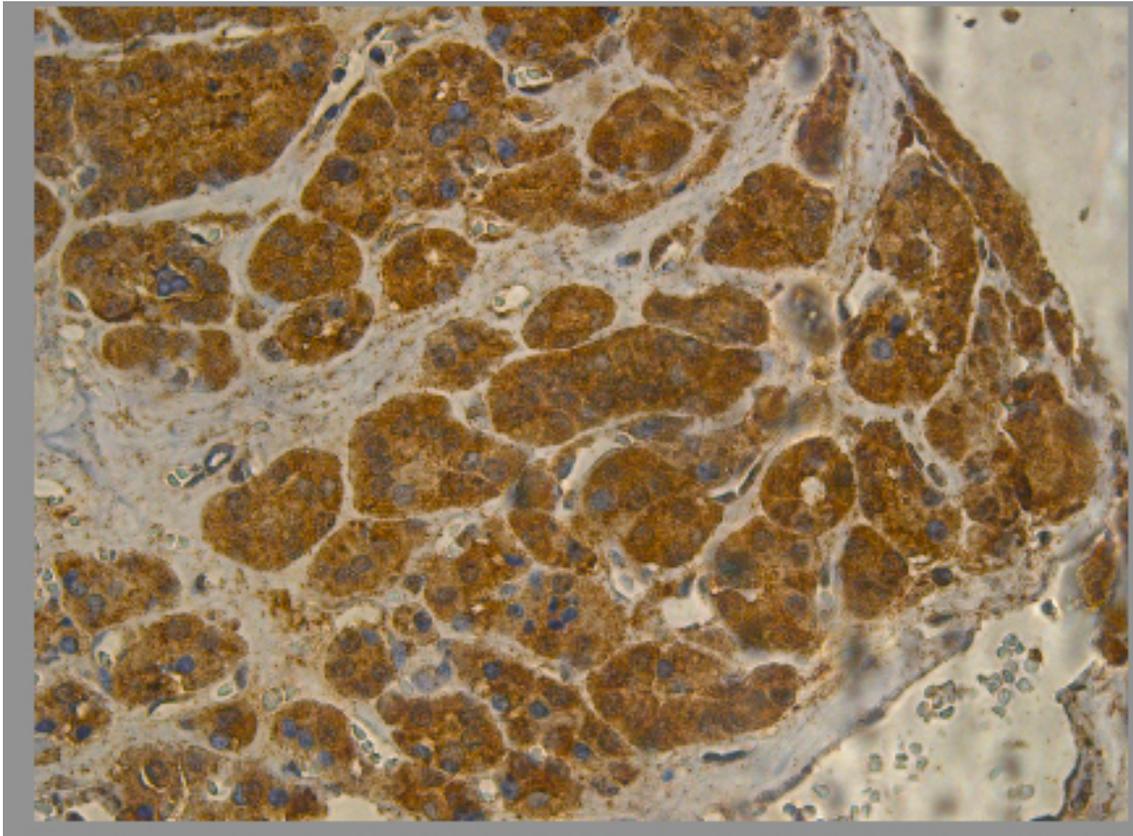
*V.5. Expressão Imunoistoquímica dos casos selecionados*

---

**FIGURA 5.** Imunohistoquímica em um dos bóciós da amostra, expressando pouca reatividade para grelina (seta, 200x).



**FIGURA 6.** Imunohistoquímica em um dos carcinoma papilíferos da amostra, expressando forte reatividade para grelina (200x).



#### ***V.6. Da análise dos dados clínicos***

Não encontramos correlação entre a dosagem de grelina sérica e idade ( $p = 0,9314$ ), IMC ( $p = 0,3973$ ), sexo ( $p=0.9322$ ) e etnia ( $p=0.31$ ), porém parece haver uma ligeira tendência para a correlação entre paridade ( $p = 0,09$ ) e características

próprias do tumor, como o tamanho do nódulo ( $p = 0,06$ ) e a presença de anticorpos anti- tiroglobulina ( $p= 0,0907$ ).

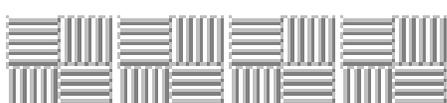
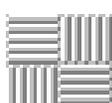
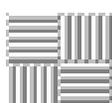
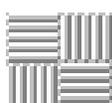
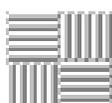
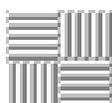
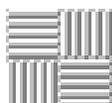
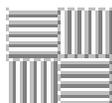
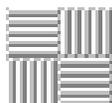
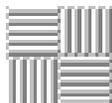
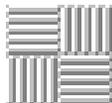
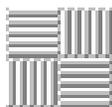
**TABELA 9.** Tabela demonstrando o baixo poder discriminatório entre os níveis séricos de grelina e características clínico-patológicas de diagnóstico e seguimento dos pacientes portadores de carcinomas ( $p=NS$ ).

		CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE (N = 53)			
		<10mm	>10mm	TOTAL	
Aspectos Clínicos	Sexo	M	2 (7%)	9 (36%)	11 (21%)
		F	26 (93%)	16 (64%)	42 (79%)
	Idade (49,3±16,2)	>45a.	12 (43%)	18 (72%)	30 (57%)
		≤45a.	16 (57%)	7 (28%)	23 (43%)
Diagnóstico	LN + (US) / cN+		2 (7%)	7 (28%)	9 (17%)
	Histologia	marg +	2 (7%)	5 (20%)	7 (13%)
		multifoc	8 (28%)	6 (24%)	14 (27%)
	Estádio	pN+ (III)	1 (3,5%)	6 (24%)	7 (13%)
M+ (IV)		0	2 (8%)	2 (3%)	
Seguimento	Tg e/ou US -		27 (97%)	12 (48%)	39 (73%)
	Tg e/ou US +		1 (3%)	13 (52%)	14 (27%)
	Doença clínica (M+)		0	2 (8%)	2 (3,8%)
	<b>TOTAL</b>		<b>28</b>	<b>25</b>	<b>53 (100%)</b>

**TABELA 10** - Expressão tecidual e diagnóstico – observar que a imunoistoquímica (IHQ) apresentou significância estatística ( $p < 0,0001$ ) na discriminação de malignidade para a amostra estudada (29 casos)

		CASOS SELECIONADOS PARA IHQ (N=29)		
		IHQ + (>2)	IHQ - (<2)	p
Sexo	M	4 (22,2%)	1 (9%)	0,6221
	F	14 (77,8%)	10 (91%)	
Idade	≤45a.	16 (88,8%)	6 (54,5%)	0,0712
	>45a.	2 (11,2%)	5 (45,4%)	
IMC	< 30	7 (38,8%)	8 (72,7%)	0,0768
	≥30	11 (61,2%)	3 (27,2%)	
Histologia	Benigna	2 (11,1%)	10 (91%)	<0,0001
	Maligna	16 (88,8%)	1 (9%)	
<b>TOTAL</b>		<b>18</b>	<b>11</b>	

*Qui-quadrado, Teste Exato de Fisher*



## VI. Discussão

## VI. DISCUSSÃO

---

### *VI.1. Generalidades*

O carcinoma papilífero de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum em humanos, correspondendo a cerca de 1% de todos os tumores malignos, afetando principalmente mulheres <sup>(73)</sup>.

Devido às novas tecnologias em imagem, especialmente com o advento da ultrassonografia de alta resolução, a sensibilidade para a detecção de nódulos e as técnicas para punção e diagnóstico citológico tiveram grande evolução. Contudo, estes métodos também levaram à identificação de tumores cada vez menores, que possuem seu significado clínico questionável a despeito do diagnóstico de câncer, sendo um grande número destes de pouca relevância clínica <sup>(74)</sup>. Tem-se ainda que as estratificações de risco nem sempre são concisas sobre o seguimento a ser adotado para cada paciente <sup>(69, 75, 76)</sup>.

Uma série de técnicas modernas, incluindo imunoistoquímica e análises moleculares, têm sido aplicadas na tentativa de se estabelecer o diagnóstico de malignidade e realizar distinção de gravidade entre os nódulos de relevância. Porém, todos os marcadores descritos até o momento, demonstraram limitações.

Apesar de já ser conhecida a ocorrência da expressão de grelina em outros tumores <sup>(77)</sup>, a utilidade clínica da expressão deste peptídeo como um indicador de doença não foi explorada até o momento, e é bem estabelecido também que cerca de 20% a 30% dos nódulos tireoidianos submetidos à punção aspirativa por agulha fina

(PAAF) são diagnosticados como indeterminados ao exame citológico <sup>(78)</sup>.

## ***VI.2. Contribuição do Trabalho Atual***

O presente trabalho demonstrou que a expressão imunoistoquímica de grelina ocorreu de modo qualitativamente superior nos carcinomas papilíferos quando comparada às lesões benignas, corroborando achados de Zhang e cols.<sup>(50)</sup> e identificando assim um possível marcador de predisposição à malignidade.

No presente estudo foi quantificada a expressão em blocos provenientes de espécimes cirúrgicos, porém acreditamos que este método poderia ser perfeitamente aplicável ao espécime obtido por punção, sugerindo assim uma importante ferramenta diagnóstica factível, de boa sensibilidade, especificidade, acurácia e reproduzível em larga escala, de acordo com o postulado por Mitteldorf e cols. em 2008 <sup>(79)</sup>, muito embora este não tenha feito referência específica à grelina.

Os dados deste trabalho sugerem que, diferentemente da dosagem sérica de grelina, na qual não obtivemos resultados expressivos, sua expressão imunoistoquímica em tecidos tumorais pode certamente diferenciar nódulos benignos de nódulos malignos, o que seria útil como marcador de diagnóstico não invasivo para as neoplasias tireoidianas. Quando analisamos a expressão imunoistoquímica de grelina segundo o score de Rossi observamos uma diferença nítida de expressão, conforme a tabela 4 ( $p=0,0024$ , *Mann-Whitney*):

**TABELA 11.** Resultado final da expressão de grelina exemplificando alguns dos resultados obtidos utilizando-se o score descrito por Rossi <sup>(1)</sup>, a saber: positividade: 0 (negativa), 1 (0 a 25%), 2 (25 a 50%), 3 (50 a 75%) e 4 (75 a 100%); intensidade: 0 (negativa), 1 (fraca), 2 (moderada), 3 (intensa).

Caso	Positividade	Intensidade	Score Final (Pos + Int)	AP
18885-11	4	3	7	maligno
15974-11	2	1	3	benigno
21516-11	4	2	6	maligno
15973-11	3	1	4	benigno
16935-11	4	3	7	maligno
11052-11	4	3	7	maligno
19254-11	4	2	6	benigno
3987-11	4	2	6	benigno
9681-11	4	2	6	maligno

Em relação à possível observação de dados prognósticos, este estudo não apresenta tempo de seguimento suficiente para afirmar se os valores desta proteína podem, também, influir na evolução do paciente com CDT. Não foram encontrados na literatura trabalhos sobre o estudo da expressão de grelina em espécime citológico, porém com a demonstração da forte expressão em parafina para as neoplasias malignas sugere-se que esta possa ser naturalmente transposta para a citologia, de modo a se obter ferramenta diagnóstica auxiliar para a prática clínica.

Diferentemente do esperado, a relação direta entre a dosagem de grelina e o subgrupo de pacientes obesos não foi significativa, conforme os dados do gráfico 1 ( $p = 0,388$ ). A curva ROC (gráfico 1) não demonstrou boa especificidade e sensibilidade; não houve ponto de corte capaz de discriminar malignidade entre os nódulos da amostra, mesmo para o melhor nível sérico (230,5 ng/mL,  $p=0,4492$ ). Observaram-se ainda baixos valores valores preditivo positivo e negativo, segundo a tabela 2 ( $p=0,4462$ ).

No gráfico 3, vemos que a mesma ausência de poder discriminatório ocorreu quando se tentou estratificar os 112 pacientes pelo IMC ( $p=0,6167$ ), numa tentativa de se associar o estado clínico *obesidade* com maior ocorrência de câncer. Na correlação entre *obesidade* e características de agressividade do tumor, tivemos que o  $IMC \geq 30$  apresentou pequena tendência à maior ocorrência de metástases linfonodais ( $p=0,0784$ ), bem como de correlação com o estágio ao diagnóstico ( $p=0,0721$ )., não sendo significativa a associação entre este IMC e a ocorrência de microcarcinomas (tabela 5,  $p= 0,4898$ ).

Quando esta tentativa de estratificação se deu pelo tamanho do nódulo estratificando o subgrupo *microcarcinoma* ( $\leq 10\text{mm}$  ou  $> 10\text{mm}$ ), não foi possível, nesta casuística, demonstrar a capacidade discriminatória para malignidade dos níveis séricos de grelina. O gráfico 2 ilustra visualmente esta diferença ( $p=0,62$ ), corroborada pela ausência de correlação entre a ocorrência de microcarcinomas e

grelina (tabela 5,  $p=0,2471$ ). O número de pacientes estudados provavelmente foi o viés à análise diagnóstica adicional neste subgrupo.

O poder do estudo para a dosagem sérica de grelina foi de apenas 6% e o valor de *FPRP* 8,2%, como demonstrado na tabela 3, denotando poder insatisfatório destes níveis em predizer malignidade. Este fato se deve possivelmente ao tamanho amostral, mas pode haver diferenças de resultados em casuísticas maiores.

### ***VI.3. A expressão de grelina e outros marcadores***

Por causa da grande quantidade portadores de nódulos de tireoide, bem como da vasta ocorrência de tipos e subtipos de tumores neste grupo de neoplasias, identificar marcadores de malignidade de tireoide é essencial <sup>(51)</sup>.

A tireoglobulina sérica, único marcador conhecido e estabelecido até o presente momento, pode auxiliar no prognóstico desses pacientes, porém apresenta dificuldades práticas na sua execução, com uma imensa variabilidade de técnicas e ausência de valor diagnóstico <sup>(80, 81)</sup>. O grupo do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da UNICAMP já possui vários trabalhos associando os mais variados fatores de risco com susceptibilidade para CDT <sup>(82-86)</sup> com bons resultados, motivo pelo qual entende-se esta linha de pesquisa como bastante promissora.

A identificação de adipocinas em sangue periférico e o estudo de sua expressão em amostras teciduais de pacientes com CDT poderia ser interessante

para rastreamento populacional e também para a triagem de diferentes grupos de risco dentre portadores de carcinoma já diagnosticados. Porém não encontramos neste estudo níveis de grelina que pudessem prever risco nem discriminar comportamento específico para o subgrupo microcarcinoma, apesar de a expressão imunohistoquímica das amostras analisadas em conjunto claramente delinearem um perfil de susceptibilidade para o grupo CDT como um todo.

A literatura já contempla especificamente a expressão e/ou dosagem sérica do peptídeo grelina e seu receptor em diferentes tecidos, normais e/ou neoplásicos, para as glândulas tireoide e paratireoide <sup>(39, 40)</sup>, hipófise <sup>(87)</sup>, próstata <sup>(88)</sup>, rins <sup>(89)</sup>, mamas <sup>(90)</sup>, pulmões <sup>(91)</sup> e trato gastrointestinal <sup>(92)</sup>; porém nenhum destes trabalhos trata com especificidade da diferença na expressão entre tecidos benignos e malignos com o intuito de identificar malignidade. Zhang e cols.<sup>(50)</sup> não encontraram resultados expressivos na análise das doenças benignas, focando sua análise na grande imunoreatividade encontrada para os nódulos malignos, num estudo apenas descritivo sem associação estatística; de modo que este estudo, apesar de preliminar, ainda é inédito e sem comparativos.

É plausível também que sua expressão em tecido neoplásico correlacione-se com outros marcadores de obesidade já em estudo, ajudando a definir casos de maior agressividade e propiciando assim uma maior individualização do tratamento quando de sua detecção, otimizando, num futuro próximo, a prática clínica do tratamento não só do carcinoma papilífero, bem como de todo o espectro das

doenças tireoidianas não-neoplásicas. É possível ainda que, na ausência de características específicas para o grupo dos microcarcinomas, este marcador inflamatório (em sangue circulante ou tecido) possa servir como elemento de identificação diagnóstica.

Em muitos trabalhos os microcarcinomas têm-se apresentado como uma entidade clínica distinta, com comportamento aparentemente específico e que vêm merecendo atenção, por sua incidência crescente e por seu significado clínico incerto<sup>(66)</sup>. É possível que a negatividade para risco da relação entre a dosagem sérica de grelina e microcarcinoma encontrada em nosso estudo seja uma característica intrínseca desta entidade de acordo com alguns dados da literatura, porém mais estudos são necessários pois pode estar havendo também viés amostral. Não foram encontrados dados a respeito da quantificação da proteína grelina em microcarcinomas, de modo que para este subgrupo este estudo, apesar dos resultados ainda insatisfatórios, também é inédito.

Não houve correlação entre a dosagem sérica de grelina e dados clínicos como idade ( $p = 0,9314$ ), sexo ( $p=0.9322$ ) e etnia ( $p=0.31$ ), porém parece haver uma ligeira tendência para a correlação entre paridade ( $p = 0,09$ ) e características próprias do tumor, como o tamanho do nódulo ( $p = 0,06$ ) e a presença de anticorpos anti-tiroglobulina ( $p= 0,0907$ ). A tendência de associação entre níveis séricos de grelina e autoanticorpos foi encontrada tanto em toda a casuística de tumores malignos quanto no subgrupo *microcarcinoma*, e pode encontrar explicação possível na etiopatogenia

inflamatória dos estados tumorais e autoimunes; porém, esta associação e sua ligação com a evolução da doença precisa ser mais bem investigada.

É plausível pensar que estes marcadores, isoladamente ou em conjunto, possam auxiliar a definir casos de maior agressividade, propiciando maior individualização do tratamento e até mesmo potenciais terapias-alvo, em consonância com a literatura <sup>(93)</sup>.

As perspectivas, portanto, são otimistas e promissoras, e o campo de estudo está aberto. Há muito trabalho a fazer, e já foi bem demonstrado que traçar perfis moleculares de risco pode vir a ser uma questão de grande utilidade pública. O estudo dos marcadores moleculares em tireoidologia já é motivo de estudos frequentes, estando inserido no contexto atual do ensino médico, fazendo cada vez mais parte de diretrizes e consensos de orientação médica <sup>(94)</sup>, sendo, portanto uma realidade que devemos contemplar.

Proteínas podem ser visualizadas através de técnicas relativamente simples como a imunistoquímica, auxiliando na definição de um tipo histológico na caracterização de malignidade dos nódulos tireoidianos e até de agressividade em nódulos sabidamente malignos. Muitos marcadores de malignidade têm sido investigados, mas todos apresentam alguma desvantagem ou limitação. O presente trabalho visou elucidar estas características patogênicas; como possível marcadora de ativação de vias de sinalização tumorais, o peptídeo grelina demonstrou ser, ao

menos no que tange à sua expressão, ferramenta útil na identificação de carcinoma papilífero da tireoide.

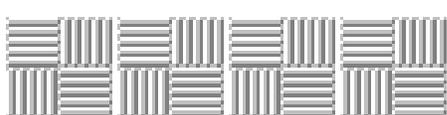
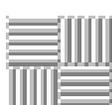
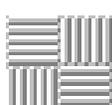
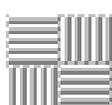
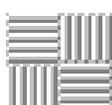
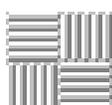
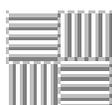
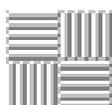
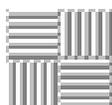
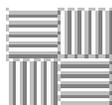
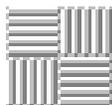
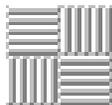
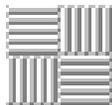
Observando nossos resultados em expressão, pode-se inferir que o uso deste marcador pode ser útil não somente no reconhecimento de malignidade para o carcinoma papilífero, como também extrapolar este modelo de estudo para as lesões foliculares e suas variantes no que tange à questão diagnóstica, na tentativa de agregar ao painel de suscetibilidade mais um potencial marcador. Infelizmente não obtivemos no presente trabalho correlação entre expressão e dosagem sérica de grelina e evolução, não alcançando, portanto, objetivos prognósticos.

Identificar os indivíduos que possuem um risco aumentado para o câncer de tireoide é importante para planejar e implementar políticas de prevenção e estratégias de conduta não apenas em nível de saúde pública, mas também para cada paciente em particular. Assim como em outros países, temos verificado um grande aumento no número de indivíduos identificados como portadores de nódulos de tireoide graças ao maior acesso da população ao sistema de saúde e, sobretudo, a métodos diagnósticos não invasivos, simples, rápidos e de custo relativamente baixo em nosso meio, como o ultrassom <sup>(51, 95, 96)</sup>. Esta crescente população faz prever que devemos ter, nos próximos anos, uma imensa massa de indivíduos buscando aconselhamento médico. O que faremos com estes pacientes?

O uso de marcadores moleculares de risco, identificados através de um

simples exame em sangue periférico ou análise patológica, poderia auxiliar no rastreamento de malignidade. Pode-se, por exemplo, programar ultrassons periódicos de modo a obter citologia de nódulos de maior risco. Ao contrário, pacientes portando nódulos de baixo risco para malignidade, poderiam ser acompanhados apenas clinicamente ou de forma menos frequente, poupando grandes somas de dinheiro ao sistema de saúde e diminuindo consideravelmente o espectro da dúvida sobre os portadores de nódulos, além de conferir mais segurança ao diagnóstico médico em oncologia.

Marcadores moleculares em tireoide podem ser aplicados a todos os indivíduos em qualquer fase de sua vida. Assim, tornariam-se uma importante ferramenta de rastreamento populacional, identificando indivíduos com risco maior para o câncer tireoidiano dentre a vasta maioria de nódulos benignos. Sem dúvida, tal rastreamento poderia baratear sensivelmente o custo do diagnóstico e teria grande impacto social.



## VII. Conclusão

## VII. CONCLUSÃO

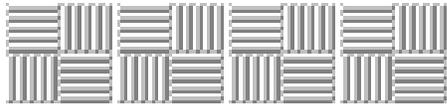
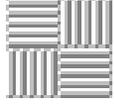
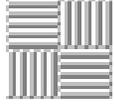
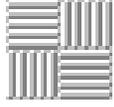
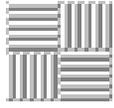
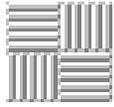
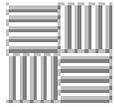
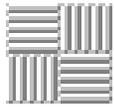
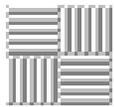
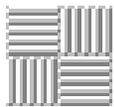
---

Baseando-nos nas hipóteses iniciais, temos que:

- Apesar de os níveis séricos de grelina não terem apresentado associação diagnóstica significativa, observou-se que a expressão tecidual auxiliou na detecção e discriminação de malignidade;

- Os níveis séricos de grelina apresentaram baixa especificidade como marcador para as características estudadas, porém a expressão tecidual apresentou tendência de correlação com idade e o IMC dos pacientes estudados e importante associação discriminatória para malignidade;

- Tanto os níveis séricos de grelina quanto sua imunorreatividade tecidual não apresentaram utilidade como marcador de agressividade ou prognóstico na amostra estudada.



## VIII. Referências

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

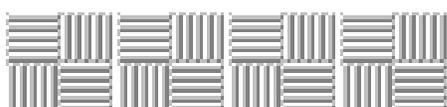
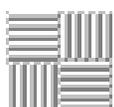
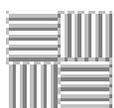
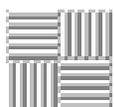
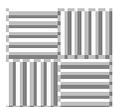
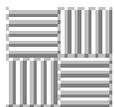
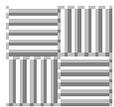
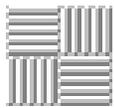
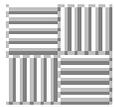
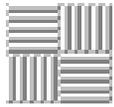
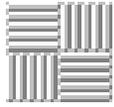
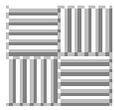
1. Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, Chinellato S, Orvieto E, Canal F, et al. Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*. 2005 Aug;124(2):295-302.
2. Organization WH. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
3. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006 May 10;295(18):2164-7.
4. Sahin M, Ucan B, Ginis Z, Topaloglu O, Gungunes A, Bozkurt NC, et al. Vitamin D3 levels and insulin resistance in papillary thyroid cancer patients. *Med Oncol*. 2013 Jun;30(2):589.
5. Pasco JA, Brennan SL, Kotowicz MA. Morbid obesity in women on the rise: an observational, population-based study. *BMC Public Health*. Apr 2;13(1):290.
6. Popkin BM, Doak CM. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev*. 1998 Apr;56(4 Pt 1):106-14.
7. Blumenkrantz M. Obesity: the world's metabolic disorder (online). Beverly Hills 1997; Available from: [www.quantumhpc.com/obesity.htm](http://www.quantumhpc.com/obesity.htm).
8. Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr*. 1995 Feb;49(2):105-13.
9. Froguel P. [Recent advances in the genetics of obesity]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2000 Dec;61 Suppl 6:3.
10. Munzberg H, Tafel J, Busing B, Hinney A, Ziegler A, Mayer H, et al. Screening for variability in the ciliary neurotrophic factor (CNTF) gene: no evidence for association with human obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998;106(2):108-12.
11. Halpern A, Heymsfield SB, Van Gaal L. Pharmacologic treatment of obesity. *J Obes*. 2011;75:1063.
12. W.H.O. Obesity: Preventing and Managing Global Epidemic. 2005; Available from: [www.who.int/nutrition/publications/obesity\\_executive\\_summary.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity_executive_summary.pdf).
13. I.B.G.E. Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição. 1989; Available from: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br).
14. Coutinho WF. Consenso Latino Americano de Obesidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 1999;43(1):21-67.
15. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*. 2010 Jan 20;303(3):235-41.
16. Baron M. Neurogenetic determinism. *Nature*. 1995 Jun 1;375(6530):351.
17. Stunkard AJ, Wadden TA. Psychological aspects of severe obesity. *Am J Clin Nutr*. 1992 Feb;55(2 Suppl):524S-32S.
18. Wunsch Filho V, Moncau JE. [Cancer mortality in Brazil 1980-1995: regional patterns and time trends]. *Rev Assoc Med Bras*. 2002 Jul-Sep;48(3):250-7.
19. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol*. 2002 Sep;3(9):565-74.
20. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Weight control and physical activity in cancer prevention. *Obes Rev*. 2002 Feb;3(1):5-8.
21. Kitahara CM, Platz EA, Freeman LE, Hsing AW, Linet MS, Park Y, et al. Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Mar;20(3):464-72.
22. Mijovic T, How J, Pakdaman M, Rochon L, Gologan O, Hier MP, et al. Body mass index in the evaluation of thyroid cancer risk. *Thyroid*. 2009 May;19(5):467-72.

23. Stengel A, Tache Y. Gastric peptides and their regulation of hunger and satiety. *Curr Gastroenterol Rep.* Dec;14(6):480-8.
24. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):656-60.
25. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J.* 2004 Mar;18(3):439-56.
26. Phillips M. Hunger Hormone Tied to Learning. 2007 (online); Available from: [www.the-scientist.com/news/display/23132](http://www.the-scientist.com/news/display/23132).
27. Katargari SA, Milousis A, Pagonopoulou O, Asimakopoulos B, Nikolettos NK. Ghrelin in pathological conditions. *Endocr J.* 2008 Jul;55(3):439-53.
28. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* 2002 May 23;346(21):1623-30.
29. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science.* 2005 Nov 11;310(5750):996-9.
30. Leontiou CA, Franchi G, Korbonits M. Ghrelin in neuroendocrine organs and tumours. *Pituitary.* 2007;10(3):213-25.
31. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 2000 Nov;141(11):4255-61.
32. Ghigo E, Arvat E, Giordano R, Broglio F, Gianotti L, Maccario M, et al. Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine.* 2001 Feb;14(1):87-93.
33. Repaci A, Gambineri A, Pagotto U, Pasquali R. Ghrelin and reproductive disorders. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 20;340(1):70-9.
34. Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm.* 2008;77:285-300.
35. Daghestani MH, El-Mazny A. Circulating ghrelin levels and the polycystic ovary syndrome: correlation with the clinical, hormonal and metabolic features. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Mar;155(1):65-8.
36. Scheid JL, De Souza MJ. Menstrual irregularities and energy deficiency in physically active women: the role of ghrelin, PYY and adipocytokines. *Med Sport Sci.*55:82-102.
37. Scheid JL, De Souza MJ, Leidy HJ, Williams NI. Ghrelin but not peptide YY is related to change in body weight and energy availability. *Med Sci Sports Exerc.* Nov;43(11):2063-71.
38. Guillory B, Splenser A, Garcia J. The role of ghrelin in anorexia-cachexia syndromes. *Vitam Horm.*92:61-106.
39. Raghay K, Garcia-Caballero T, Nogueiras R, Morel G, Beiras A, Dieguez C, et al. Ghrelin localization in rat and human thyroid and parathyroid glands and tumours. *Histochem Cell Biol.* 2006 Mar;125(3):239-46.
40. Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, et al. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol.* 2003 Feb;162(2):645-54.
41. Kosowicz J, Baumann-Antczak A, Ruchala M, Gryczynska M, Gurgul E, Sowinski J. Thyroid hormones affect plasma ghrelin and obestatin levels. *Horm Metab Res.* Feb;43(2):121-5.
42. Altinova AE, Toruner FB, Akturk M, Elbeg S, Yetkin I, Cakir N, et al. Reduced serum acylated ghrelin levels in patients with hyperthyroidism. *Horm Res.* 2006;65(6):295-9.

43. Sadegholvad A, Afkhamizadeh M, Ranjbar-Omrani G. Serum ghrelin changes in thyroid dysfunction. *Arch Iran Med.* 2007 Apr;10(2):168-70.
44. Kluge M, Riedl S, Uhr M, Schmidt D, Zhang X, Yassouridis A, et al. Ghrelin affects the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in humans by increasing free thyroxine and decreasing TSH in plasma. *Eur J Endocrinol.* Jun;162(6):1059-65.
45. Gjedde S, Vestergaard ET, Gormsen LC, Riis AL, Rungby J, Moller N, et al. Serum ghrelin levels are increased in hypothyroid patients and become normalized by L-thyroxine treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jun;93(6):2277-80.
46. Kokkinos A, Mourouzis I, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N, Cokkinos DV. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine.* 2007 Aug;32(1):30-2.
47. Altinova AE, Toruner F, Karakoc A, Yetkin I, Ayvaz G, Cakir N, et al. Serum Ghrelin Levels in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid.* 2006 Dec;16(12):1259-64.
48. Park YJ, Lee YJ, Kim SH, Joung DS, Kim BJ, So I, et al. Ghrelin enhances the proliferating effect of thyroid stimulating hormone in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Mar 26;285(1-2):19-25.
49. Karaoglu A, Aydin S, Dagli AF, Cummings DE, Ozercan IH, Canatan H, et al. Expression of obestatin and ghrelin in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2009 Mar;323(1-2):113-8.
50. Zhang YF, Wang HN, Hong TP. [Ghrelin expression in the tissues of different thyroid diseases]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2006 Apr 18;38(2):193-6.
51. Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med.* 1997 Feb 1;126(3):226-31.
52. Boone RT, Fan CY, Hanna EY. Well-differentiated carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Clin North Am.* 2003 Feb;36(1):73-90, viii.
53. LiVolsi VA. Papillary neoplasms of the thyroid. Pathologic and prognostic features. *Am J Clin Pathol.* 1992 Mar;97(3):426-34.
54. Schlumberger M, Sherman SI. Approach to the patient with advanced differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol.* Jan;166(1):5-11.
55. Nishida T, Nakao K, Hamaji M, Nakahara MA, Tsujimoto M. Overexpression of p53 protein and DNA content are important biologic prognostic factors for thyroid cancer. *Surgery.* 1996 May;119(5):568-75.
56. International Union Against Cancer. Available from: [www.uicc.org](http://www.uicc.org).
57. de Lellis RA LR, Heitz PU, Eng C. WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumours of Endocrine Organs. Lyon: IARC Press; 2004. p. 54-5.
58. Bramley MD, Harrison BJ. Papillary microcarcinoma of the thyroid gland. *Br J Surg.* 1996 Dec;83(12):1674-83.
59. Lupoli G, Vitale G, Caraglia M, Fittipaldi MR, Abbruzzese A, Tagliaferri P, et al. Familial papillary thyroid microcarcinoma: a new clinical entity. *Lancet.* 1999 Feb 20;353(9153):637-9.
60. Bisi H, Fernandes VS, de Camargo RY, Koch L, Abdo AH, de Brito T. The prevalence of unsuspected thyroid pathology in 300 sequential autopsies, with special reference to the incidental carcinoma. *Cancer.* 1989 Nov 1;64(9):1888-93.
61. Hughes DT, Haymart MR, Miller BS, Gauger PG, Doherty GM. The most commonly occurring papillary thyroid cancer in the United States is now a microcarcinoma in a patient older than 45 years. *Thyroid.* Mar;21(3):231-6.
62. Mortensen JD, Bennett WA, Woolner LB. Incidence of carcinoma in thyroid glands removed at 1000 consecutive routine necropsies. *Surg Forum.* 1955;5:659-63.

63. Cho JS, Yoon JH, Park MH, Shin SH, Jegal YJ, Lee JS, et al. Age and prognosis of papillary thyroid carcinoma: retrospective stratification into three groups. *J Korean Surg Soc.* Nov;83(5):259-66.
64. Noguchi S, Yamashita H, Uchino S, Watanabe S. Papillary microcarcinoma. *World J Surg.* 2008 May;32(5):747-53.
65. Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World J Surg.* Jan;34(1):28-35.
66. Ito Y, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, et al. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid.* 2003 Apr;13(4):381-7.
67. Ramos AM, Sales Ade O, Barbalho de Mello LE, Cirino de Andrade M, Pinto Paiva F, Ramos CC, et al. Absence of peritumoral fibrosis or inflammatory infiltrate may be related to clinical progression of papillary thyroid microcarcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2009 Dec;17(6):432-7.
68. Kim HY, Park WY, Lee KE, Park WS, Chung YS, Cho SJ, et al. Comparative analysis of gene expression profiles of papillary thyroid microcarcinoma and papillary thyroid carcinoma. *J Cancer Res Ther.* Oct-Dec;6(4):452-7.
69. Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, et al. [Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jul;51(5):867-93.
70. Tincani AJ, Hojaj F.C., Teixeira G.V., Araújo P.P.C. Câncer Diferenciado de Tireoide: Tratamento Cirúrgico. In: Panamericana, editor. *PRODIRETRIZES.* Porto Alegre: Artmed; 2010. p. 107-31.
71. Ward LS, Maciel R.B. . Available from: [http://www.projetodiretrizes.org.br/5\\_volume/12-Cancetireoide.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/5_volume/12-Cancetireoide.pdf).
72. Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar 17;96(6):434-42.
73. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control.* 2009 Jul;20(5):525-31.
74. Pazaitou-Panayiotou K, Capezzone M, Pacini F. Clinical features and therapeutic implication of papillary thyroid microcarcinoma. *Thyroid.* 2007 Nov;17(11):1085-92.
75. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2006 Feb;16(2):109-42.
76. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol.* 2006 Jun;154(6):787-803.
77. Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res.* 2009 Nov;41(11):814-21.
78. Baloch ZW, LiVolsi VA. Fine-needle aspiration of the thyroid: today and tomorrow. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Dec;22(6):929-39.
79. Mitteldorf CA, de Sousa-Canavez JM, Massumoto C, da Camara-Lopes LH. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules as a possible source for molecular studies: analysis of RNA obtained from routine cases. *Diagn Cytopathol.* 2008 Dec;36(12):899-903.
80. Spencer CA, Lopresti JS. Measuring thyroglobulin and thyroglobulin autoantibody in patients with differentiated thyroid cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Apr;4(4):223-33.

81. Whitley RJ, Ain KB. Thyroglobulin: a specific serum marker for the management of thyroid carcinoma. *Clin Lab Med.* 2004 Mar;24(1):29-47.
82. Araujo PP, Marcello MA, Tincani AJ, Guilhen AC, Morari EC, Ward LS. mRNA BRAF expression helps to identify papillary thyroid carcinomas in thyroid nodules independently of the presence of BRAFV600E mutation. *Pathol Res Pract.* Aug 15;208(8):489-92.
83. Bufalo NE, Leite JL, Guilhen AC, Morari EC, Granja F, Assumpcao LV, et al. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Dec;13(4):1185-93.
84. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett.* 2004 Jul 16;210(2):151-7.
85. Guilhen AC, Bufalo NE, Morari EC, Leite JL, Assumpcao LV, Tincani AJ, et al. Role of the N-acetyltransferase 2 detoxification system in thyroid cancer susceptibility. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 1;15(1):406-12.
86. Morari EC, Leite JL, Granja F, da Assumpcao LV, Ward LS. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Nov;11(11):1485-8.
87. Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine.* 2001 Feb;14(1):101-4.
88. Malendowicz W, Ziolkowska A, Szyszka M, Kwias Z. Elevated blood active ghrelin and unaltered total ghrelin and obestatin concentrations in prostate carcinoma. *Urol Int.* 2009;83(4):471-5.
89. Dagli AF, Aydin S, Karaoglu A, Akpolat N, Ozercan IH, Ozercan MR. Ghrelin expression in normal kidney tissue and renal carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2009;205(3):165-73.
90. Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Apr;86(4):1738-45.
91. Arnaldi G, Mancini T, Kola B, Appolloni G, Freddi S, Concettoni C, et al. Cyclical Cushing's syndrome in a patient with a bronchial neuroendocrine tumor (typical carcinoid) expressing ghrelin and growth hormone secretagogue receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Dec;88(12):5834-40.
92. Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, et al. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5667-74.
93. Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G. Ghrelin's role on gastrointestinal tract cancer. *Surg Oncol.* 2010 Mar;19(1):e2-e10.
94. Araújo PPC. Marcadores Tumorais nas Neoplasias de Tireoide. In: PROENDOCRINO, editor. Porto Alegre: Artmed; 2009. p. 9-30.
95. Chow SM, Law SC, Au SK, Mang O, Yau S, Yuen KT, et al. Changes in clinical presentation, management and outcome in 1348 patients with differentiated thyroid carcinoma: experience in a single institute in Hong Kong, 1960-2000. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2003 Sep;15(6):329-36.
96. Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocr Rev.* 2003 Feb;24(1):102-32.



## IX. Anexos



**LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas  
Departamento de Clínica Médica**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide**  
**Pesquisadora: Profª Dra Laura Sterian Ward**  
**Profª Dra Lígia Vera Montalli Assumpção**

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ anos    RG: \_\_\_\_\_    HC: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Telefone: \_\_\_\_\_    Data:    /    /

Concordo em doar sangue e tecido para pesquisa de ácidos nucleicos e proteínas que podem estar envolvidas em doenças malignas e benignas da tireóide. A pesquisa tem por objetivo a melhor compreensão dos fatores moleculares de diagnóstico e prognóstico. Tal pesquisa justifica-se dada a importância da compreensão destes fatores para o tratamento dos pacientes. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados de meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam utilizados na pesquisa, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação. Meus dados e o material biológico advindo da coleta poderão ser usados em novas pesquisas, caso justificativa devida, sendo estas pesquisas aprovadas devidamente pelo CEP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, submissas totalmente à devida legislação. Tenho a garantia de sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam me provocar constrangimentos ou prejuízos, tornando anônimo o material ou dados obtidos. Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento das doenças tireoidianas no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora. Não terei nenhuma forma de reembolso, já que não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual. Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no contato ao CEP (infracitado), bem como denunciar quaisquer procedimentos que infrinjam as normas do CEP. Poderei obter esclarecimentos antes, durante e depois da realização da pesquisa sobre a mesma, contactando a pesquisadora responsável Profa. Dra. Laura S. Ward no contato abaixo.

Autorizo a guarda do material biológico para fins de pesquisas futuras? ( ) Sim ( ) Não

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente

Profª Dra. Laura Sterian Ward: Coordenadora do GEMOCA- Clínica Médica/ FCM-  
UNICAMP, CEP:13081-970, Campinas, SP, (19) 3521-8954, e-mail:ward@unicamp.br

CEP: Fone: (19) 3521-8938, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP,  
e-mail: cep@fcm.unicamp.br



### ANTECEDENTES FAMILIARES

Fatores relacionados à sua família podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de câncer. Por este motivo são importantes as seguintes informações:

Algum familiar próximo possui alguma das seguintes doenças tireoidianas:

- ( ) bócio ou nódulo benigno ( ) Tireoidite ou doença de Hashimoto  
( ) Hipertireoidismo ( ) Doença de Graves  
( ) Hipotireoidismo ( ) Câncer de tireóide

Se alguém tem doença tireoidiana, faz tratamento (toma remédio, faz acompanhamento, fez cirurgia, etc)?

Algum familiar próximo já apresentou alguma doença imunológica (diabetes, lúpus, Graves, Hashimoto, artrite, etc)?

Você tem algum parente próximo que apresentou Câncer?

Relação de parentesco	Parente materno ou paterno	Tipo de câncer	Idade aproximada do diagnóstico	Era fumante	Tratamento	Curado?	

Quantas pessoas moram na sua casa?

Quantas trabalham:

Renda média:

### HISTÓRICO SOCIAL E HÁBITOS DE VIDA

Ingere bebidas alcoólicas regularmente?

- ( ) sim ( ) não ( ) atualmente não, parei há

Que tipo de bebidas (destilado, cerveja)? Freqüência:

Complete esta tabela se consome ou consumiu bebidas alcoólicas no passado:

Bebida	Quantas doses?	Por quanto tempo(anos)
Cerveja(1 lata)		
Vinho (1 copo)		
Pinga(1 dose)		

É fumante?

- ( ) sim ( ) não ( ) atualmente não, já parei há

Se fumou ou fuma, indique para cada idade, quantos cigarros fuma ou fumou por dia (um maço=20 cigarros)

Quantas horas por dia você faz atividades físicas (como caminhar, correr, nadar, musculação, ou outras)? \_\_\_\_\_ . Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_ .

### AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

Peso atual: \_\_\_\_\_ Estatura: \_\_\_\_\_

Hábito intestinal: \_\_\_\_\_ Hábito urinário: \_\_\_\_\_

Alteração de peso recente: \_\_\_\_\_ Quantos quilos: \_\_\_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

Faz algum controle na alimentação: \_\_\_\_\_ Qual: \_\_\_\_\_

Dietas anteriores/ resultado: \_\_\_\_\_

Patologia associada : HAS, DM, Colesterol, triglicérides, etc...

### ANNAMENESE ALIMENTAR (QUALIDADE E QUANTIDADE)

Frequência de Consumo(DIÁRIO, SEMANAL, EVENTUAL, NUNCA)

Arroz					Derivados					Café				
Macarrão					Carnes					Enlatados				
Batata/fec.					Embutidos					Congelados				
Pão					Ovos					Cereais				
Bolacha					Feijão/Legum.					Condimentos				
Verduras					Margarina					Fast-foods				
Legumes					Frituras					Churrasco				
Fruta					Doces									
Leite					Refrigerante									

Descreva seu dia alimentar (o que come geralmente):

Café	Lanche	Almoço	lanche	jantar	ceia

Consumo de líquidos: \_\_\_\_\_ Quant./Freq.: \_\_\_\_\_

### QUALIDADE DE VIDA

- 1) Você está satisfeito (a) com seu conhecimento sobre a doença? ( ) sim ( ) não
- 2) Ela afetou seu humor, trazendo sintomas de depressão ou ansiedade? ( ) sim ( ) não
- 3) Ela afetou sua vida familiar? ( ) sim ( ) não
- 4) Ela afetou sua vida profissional? ( ) sim ( ) não
- 5) Ela afetou sua aparência? ( ) sim ( ) não
- 6) Ela afetou seu lazer? ( ) sim ( ) não
- 7) Você obteve informações suficientes sobre sua cirurgia? ( ) sim ( ) não
- 8) Os tratamentos causaram desconforto? ( ) sim ( ) não
- 9) Você teve orientação adequada sobre cura, sobrevida e depois de seu tratamento?( ) sim ( ) não
- 10) Você foi orientado adequadamente sobre a continuidade do seu tratamento após a cirurgia? ( ) sim ( ) não
- 11) Você tem ou teve algum medo relacionado a sua doença? ( ) sim ( ) não
- 12) A doença alterou sua alimentação? ( ) sim ( ) não
- 13) Você sentiu diferença no apetite ? ( ) sim ( ) não
- 14) Quais as alterações notadas? \_\_\_\_\_
- 15) Alteração de peso? ( ) sim ( ) não - quantos quilos/ \_\_\_\_\_

### PERGUNTAS APENAS PARA MULHERES

Qual a idade de primeira menstruação (menarca)?

Já fez uso de anticoncepcionais orais? Quanto tempo?

( ) atualmente sim ( ) sim, mas não atualmente. ( ) não

Gravidez?

Quantos abortos espontâneos?

Com que idade ocorreu a menopausa?

Por que motivo:

Faz ou fez uso de reposição hormonal?

Qual:

Idade: