

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

JULIANA ROCHA COSTA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTEN EM CARCINOMA PAPILAR DE
TIROIDE**

Belo Horizonte

2012

JULIANA ROCHA COSTA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTEN EM CARCINOMA PAPILAR DE
TIREOIDE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Medicina Molecular. Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Orientadora: Maria Marta Sarquis Soares

Belo Horizonte

2012

Aos meus filhos, João e Laura, por inspirarem meu viver.

Ao meu marido, Telmo, pelo amor e companheirismo.

Ao meu pai, Walder, meu grande exemplo e referência.

À minha mãe, Tereza, pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos Patrícia e Gustavo, pelo carinho

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Marta Sarquis Soares, pela confiança, estímulo e orientação.

À Professora Paula Vieira Teixeira Vidigal, pela avaliação histológica e constante disponibilidade.

Ao Professor Eduardo Pimentel Dias pelo grande apoio na discussão do trabalho.

Aos pacientes do Hospital Mário Penna que gentilmente deram seu consentimento para participar do estudo.

Ao Dr Paulo Guilherme de Oliveira Salles, pela disponibilização dos blocos de parafina para a confecção das lâminas.

À Margaret Aparecida Gomes, pela colaboração no preparo das lâminas.

À Luciana Gonçalves pelo apoio na análise estatística.

RESUMO

O *PTEN* (phosphatase and tensin homologue) é um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 10. O gene regula negativamente a via PI3K/Akt, estimulando a apoptose e bloqueando a proliferação e o crescimento celular. A expressão diminuída da proteína PTEN gera níveis aumentados de Akt e inibição da apoptose e dos mecanismos de controle celular.

Apesar das mutações de *PTEN* serem raras em carcinomas esporádicos da tireoide, alguns autores acharam a expressão diminuída da proteína PTEN em carcinomas foliculares e, menos comumente, carcinomas papilares e começaram a especular a influência de mecanismos epigenéticos como a hipermetilação do DNA na tumorigênese tireoideana, independentemente do tipo histológico.

O objetivo desse estudo foi correlacionar, através de imunohistoquímica, a expressão da proteína PTEN às características clínicas, histológicas e ao comportamento biológico de carcinomas papilares esporádicos.

Foram avaliados 46 pacientes, submetidos à tireoidectomia total, com diagnóstico histopatológico de carcinoma papilar de tireoide clássico ou variante folicular.

Nós observamos notável hipoexpressão da proteína PTEN na maioria dos tumores comparados ao tecido tireoideano normal, com significância estatística. Entretanto, não encontramos correlação entre a expressão de PTEN e o tamanho do tumor, o grau de agressividade tumoral ou o subtipo histológico (clássico ou variante folicular).

Nossos achados sugerem que o PTEN pode participar da oncogênese papilar, mas não confirmam seu papel como preditor de agressividade. Estudos moleculares adicionais são necessários para estabelecer o exato mecanismo de inativação do PTEN.

ABSTRACT

PTEN (phosphatase and tensin homologue) is a tumor suppressor gene, located on chromosome 10q23.3. The gene negatively regulates the PI3K/Akt pathway, stimulating apoptosis and blocking the cell proliferation and cell growth. Decreased expression of *PTEN* protein leads to increased levels of Akt and inhibition of apoptosis and cell control mechanisms..

Despite *PTEN* mutations and deletions being rare in sporadic thyroid cancer, some authors found decreased expression of *PTEN* protein in sporadic follicular and, less frequently, papillary carcinomas and starting speculate the influence of epigenetic mechanisms like DNA hypermethylation in thyroid tumorigenesis, independent of histological type.

The objective of this study was to correlate the *PTEN* protein expression with clinical, histological characteristics and tumor biological in sporadic papillary carcinomas, by immunohistochemical.

Forty six pacientes submitted to total thyroidectomy with papillary thyroid cancer or follicular variant of papillary cancer were evaluated.

We observed a notable hypoexpression of *PTEN* protein in majority of tumors compared to normal thyroid tissue, with statistic significance. However, we didn't found correlation between the expression of *PTEN* and tumor size, aggressiveness or histological subtype (classic or follicular variant).

Our findings suggest that *PTEN* can participate of papillary oncogenesis, but don't confirm its role as predictor of aggressiveness. Additional molecular studies are necessary to establish the exact mechanism of *PTEN*'s inactivation.

SUMÁRIO

1. Abreviaturas e Siglas	Página 08
2. Introdução	Página 10
2.1- O gene <i>PTEN</i>	Página 10
2.2- Sinalização da Via PI3K/Akt e Ações Moleculares do <i>PTEN</i>	Página 11
2.3- Síndromes Relacionadas às Mutações do <i>PTEN</i>	Página 14
2.4- <i>PTEN</i> e Tumorigênese Tireoideana Papilar	Página 17
3. Objetivo	Página 21
4. Materiais e Métodos	Página 22
5. Resultados	Página 25
6. Discussão	Página 35
7. Conclusão	Página 42
8. Referências Bibliográficas	Página 43
9. Anexo 1– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	Página 49
10. Anexo 2– Tabela de Dados Clínicos dos Pacientes	Página 51
11. Anexo 3– Métodos Estatísticos	Página 54

1. ABREVIATURAS E SIGLAS:

PTEN: phosphatase and tensin homologue mutated on chromosome 10

PTHS: *PTEN* Hamartoma Tumor Syndrome

PI3K/AKT : phosphatidylinositol-3 kinase/ protein kinase B

MAPK: mitogen-activated protein kinase

CS: Cowden Syndrome

BRSS: Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome

PLS: Proteus-like Syndrome

CFT: carcinoma folicular da tireoide

CAT: carcinoma anaplásico da tireoide

CPT: carcinoma papilar da tireoide

VEGFR: vascular ephitelial growth factor receptor

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor

EGFR: epidermal growth factor receptor

PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase

PIP2: phosphatidylinositol-4,5- biphosphate

PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5- trisphosphate

mTOR: mammalian target of rapamicin

Ras: rat sarcoma gene

RAFK: rapid accelerated fibrosarcoma kinase

CDT: carcinoma diferenciado da tireoide

FNMTC: carcinomas familiares da tireoide não medulares

BRAF: rapid accelerated fibrosarcoma kinase β

RET: “rearranged during transfection”*gene*

RET/PTC: *RET/PTC* rearrangement

SDHx: succinate desidrogenase gene

KLLN: kilin, p53 regulated DNA replication inhibitor gene

PIK3CA: phosphoinositide-3 kinase, catalytic, alpha polypeptide gene

PDPK: 3- phosphoinositide dependent protein kinase gene

IGF-IR: IGFreceptor

PAX8/PPAR γ : “paired box 8” and “peroxissome proliferator-activated receptor γ ”

ERK: extracellular signal-regulated kinase

TIMP3: TIMP metallopeptidase inhibitor 3 gene

SLC5A8: metalloproteinase 3, solute Carrier family number 8 gene

DAPK: death-associates protein kinase 1gene

NIS: sodium/iodide symporter gene

TSH-R: TSH receptor gene

RASSF1A: ras association domain family number 1gene

CASP8: caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase gene

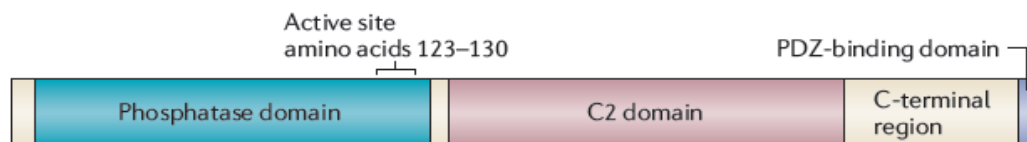
psiPTEN: *PTEN* pseudogene

2. INTRODUÇÃO

2.1- O GENE *PTEN*

O *PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), também conhecido como *MMAC1* (mutated in multiple advanced cancers) é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 10q23.3, composto de 9 éxons, com 105 kb (1,2). Codifica uma fosfatase de 403 aminoácidos, distribuída no núcleo e no citoplasma, contendo um domínio proteico (aminoácidos 14-185) e um domínio lipídico ligador da membrana (aminoácidos 190-350), ambos essenciais para a ação de supressão tumoral. Também apresenta um domínio PDZ (aminoácidos 401-403) e uma região carboxiterminal (aminoácidos 351-403) que participam na estabilidade e atividade da proteína (3).

Figura 1 – Representação esquemática da proteína PTEN: domínio fosfatase proteico, domínio fosfatase lipídico C2, região carboxiterminal e domínio ligante PDZ



FONTE: *Nat Rev Cancer* 2011;11:291

Os genes supressores de tumor codificam proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular, exercendo função inibitória ao desenvolvimento de câncer. Atuam de forma recessiva, requerendo a inativação dos 2 alelos para sua perda funcional (4).

Identificado em 1997 em mapeamento de tumores esporádicos cerebrais, de mama e próstata, o *PTEN* foi posteriormente associado a mutações germinativas descritas em síndromes hamartomatosas, como a Síndrome de Cowden (CS) (3,5).

O risco de câncer é elevado nesses pacientes. Mulheres portadoras de CS têm 25 a 50 % de chance de desenvolver câncer de mama. O risco estimado de tumores não medulares da tireoide é de 10% e de câncer de endométrio de 5 a 10%.

Também tem predisposição a carcinoma renal, melanoma e tumores gliais, em menor grau (6,7).

As neoplasias habitualmente desenvolvem-se em pacientes mais jovens quando comparadas aos tumores esporádicos e apresentam maior agressividade (8,9).

O reconhecimento dessas síndromes é extremamente relevante, por possibilitar aconselhamento genético e rastreamento tumoral precoces, contribuindo para a melhora da morbimortalidade por câncer nesse grupo (10).

Em relação às mutações, todos os éxons do *PTEN* podem sediá-las. O éxon 5 representa 20% da sequência codificadora e é a localização da maioria das mutações (3,8).

Aproximadamente 60 a 85% dos portadores de CS carregam mutações intragênicas ou na região do promotor (10). Cerca de 75% dessas mutações resultam em proteínas truncadas, perda de proteínas ou proteínas disfuncionais, com ausência ou hipoxpressão de *PTEN* (8). As deleções são incomuns.

Mutações somáticas do *PTEN* são descritas em tumores esporádicos de endométrio, cérebro, próstata e melanoma, mas são raras nos carcinomas esporádicos da tireoide, acometendo cerca de 5% dos casos segundo Dahia e colaboradores (11,12).

A perda de heterozigose é relativamente comum em até 1/4 dos os tumores tireoideanos, e a metilação aberrante do *PTEN* têm sido descrita em cerca de 50% dos tumores, particularmente em carcinomas foliculares (CFT) e carcinomas anaplásicos (CAT) (3,13).

2.2- SINALIZAÇÃO DA VIA PI3K/Akt E AÇÕES MOLECULARES DO *PTEN*

O *PTEN* é um importante controlador da via da Phosphatidylinositol-3 Kinase/Protein Kinase B (PI3K/Akt), participando na regulação de múltiplos processos biológicos como a apoptose, proliferação, metabolismo e crescimento celular.

A sinalização na via PI3K/Akt (14) é iniciada por sinais extracelulares ativando fatores de crescimento de membrana que contém receptores da tirosinoquinase como o *vascular epithelial growth factor receptor* (VEGFR), o platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) e o epidermal growth factor receptor (EGFR).

Os receptores de tirosinoquinase ativados deflagram a ativação das fosfatidilinositol-3 quinases (PI3K). Essas quinases são compostas de heterodímeros com uma subunidade regulatória, comumente a p85 e uma das subunidades catalíticas p110 tipo α (PIK3CA) ou tipo β (PIK3CB).

As subunidades catalíticas p110 fosforilam a fosfatidilinositol-4,5 bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP₃).

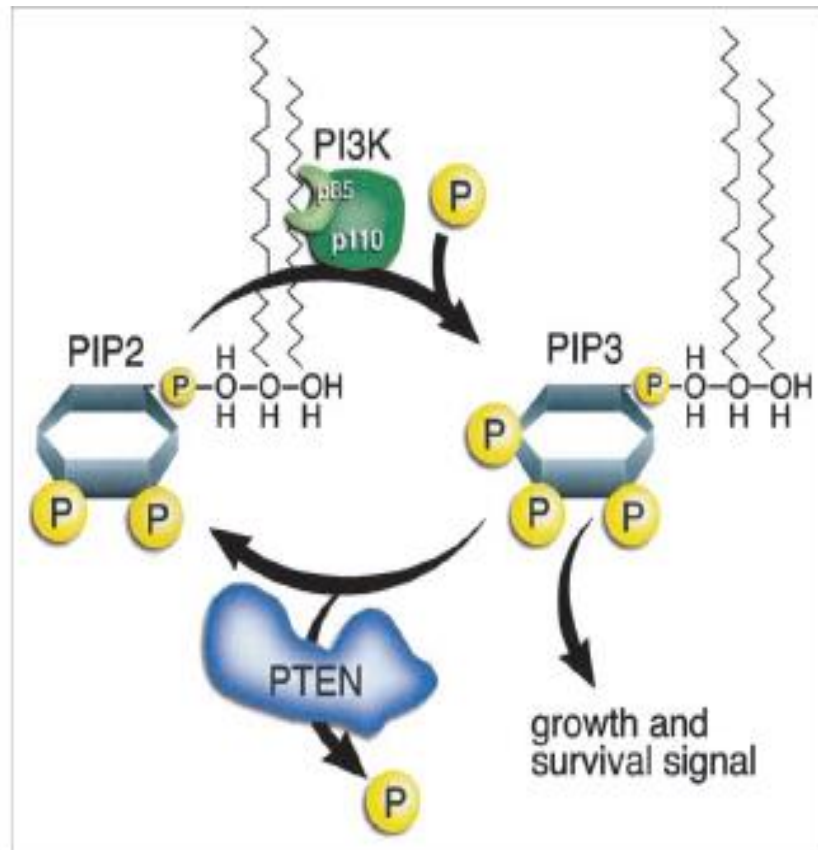
O PIP₃ direciona a Akt à membrana celular, onde esta é fosforilada e ativada por quinases fosfoinositol-dependentes (PDK), mais proeminentemente as PDK1, também recrutadas pelo PI3P. A fosforilação e ativação da Akt também podem ser induzidas por fatores de crescimento como a insulina e o IGF-1 (15,16).

A Akt é uma serina/treonina quinase e três isoformas são encontrados em tecidos humanos: Akt-1, Akt-2, Akt-3, codificadas em três diferentes genes. Sua ativação resulta em fosforilação de efetores proteicos, dentre os quais o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que têm função estabelecida na progressão da carcinogênese humana.

Além da ativação clássica, a via PI3K/Akt também pode ser ativada pelo gene *Ras*. Este gene tem papel predominante na sinalização da via da MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), interagindo com a RAF quinase. A interação direta do *Ras* com as subunidades catalíticas p110 do PI3K, através de seus sítios ligadores de *Ras*, também culminam com a ativação da Akt.

O *PTEN* regula a via PI3K/Akt impedindo a ativação da Akt. A fosfatase codificada pelo gene promove a desfosforilação do fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP₃), indispensável para a ativação da Akt (17,18).

Figura 2 – Ação do *PTEN* desfosforilando o PIP3



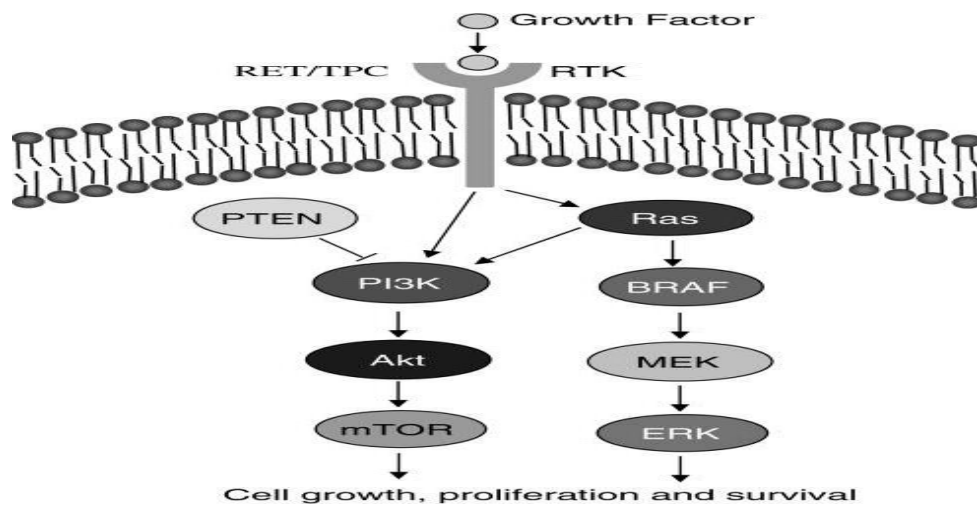
Fonte: *J Clin Oncol* 2004;22(14):2957

A proteína PTEN distribuída no citoplasma está envolvida na apoptose, modulada por sua atividade proteica, através do *downregulation* da fosforilação e ativação da Akt. A atividade lipídica acarretaria um *upregulation* da p27 (19).

A parada de progressão do ciclo celular através da *downregulation* da ciclina D1 e prevenção da fosforilação da via da MAPKinase são atribuídas à proteína PTEN encontrada no núcleo. Especula-se a modulação positiva do p53 pela PTEN nuclear. (15).

Consequentemente, a perda de função do *PTEN* perpetua a ativação da Akt, criando um mecanismo de auto-ativação cíclica, resultando numa escapada da morte celular programada e da parada do ciclo celular em G1, propiciando o crescimento tumoral.

Figura 3 – Representação esquemática das vias de sinalização da MAPK e PI3K/Akt



FONTE: *Thyroid* 2010;20(7):698

2.3- SÍNDROMES RELACIONADAS ÀS MUTAÇÕES DO *PTEN*

A Síndrome de Cowden (CS), Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRSS) e a Síndrome Proteus-like (PLS) são definidas por mutações germinativas de *PTEN* e foram unificadas em uma entidade nosológica denominada Síndrome de Tumores Hamartomatosos relacionada ao *PTEN* (PTHS) (20). A CS é notoriamente a mais conhecida.

Rachel Cowden foi a primeira paciente diagnosticada com a Síndrome de Cowden, descrita por Lloyd e Dennis em 1963 (5). Esta síndrome de transmissão autossômica dominante (9) tem incidência de 1 para 200.000 casos, provavelmente subestimada pela complexidade diagnóstica. Apenas metade dos portadores relatam história familiar positiva (21).

Caracteriza-se por lesões hamartomatosas que podem acometer múltiplos órgãos. As lesões patognomônicas são os triquilemonas, a ceratose palmo-plantar e a papilomatose oral (9,20). A penetrância é relacionada à idade, com manifestação fenotípica aos 20 anos em 90% dos casos (22). Os critérios diagnósticos da CS foram revisados pelo National Comprehensive Cancer Network em 2009 (8,23).

Tabela 1 – Critérios diagnósticos de CS (NCCN 2009)

<u>DIAGNÓSTICO DEFINITIVO</u>	<u>DIAGNÓSTICO OPERACIONAL NO INDIVÍDUO</u> (qualquer dos seguintes achados)
Identificação da mutação do <i>PTEN</i>	
CRITÉRIOS PATOGNOMÔNICOS	LESÕES MUCOCUTÂNEAS ISOLADAS
Doença de Lhermitte-Duclos (LDD)	(1 lesão dentre as 4 lesões abaixo):
Lesões mucocutâneas:	Pápulas fibrosas faciais (≥ 6), sendo pelo menos 3 trichelomomas
Trichelomomas faciais	Pápulas cutâneas faciais e Papilomatose da mucosa oral
Lesões papilomatosas	Papilomatose da mucosa oral e Ceratose acral
Ceratose acral	Ceratose palmo-plantar (6 ou mais)
CRITÉRIOS MAIORES	OU
Adenocarcinoma de mama	2 OU MAIS CRITÉRIOS MAIORES
Carcinoma da tireoide (papilar ou folicular)	(sendo um macrocefalia ou LDD)
Macrocefalia ($\geq p 97$)	Macrocefalia ($> p 97$)
Câncer de endométrio	Gangliocitoma displástico do cerebelo
Gangliocitoma displásico do cerebelo	Carcinoma folicular da tireoide
CRITÉRIOS MENORES	Adenocarcinoma de mama
Outras lesões tireoideanas (adenomas, bócio multinodular)	Câncer de endométrio
Retardo mental ($QI \leq 75$)	OU
Pólipos gastrointestinais hamartomatosos	1 CRITÉRIO MAIOR E 3 CRITÉRIOS MENORES
Fibroadenomas de mamas ou doença fibrocística	OU
Lipomas	4 OU MAIS CRITÉRIOS MENORES
Fibromas mucocutâneos	
Tumores genitourinários (leiomiomas uterinos, carcinoma de células renais)	<u>DIAGNÓSTICO OPERACIONAL EM FAMILIAR DE PACIENTE COM CS</u>
Malformações genitourinárias (útero bicorno, rim em ferradura)	1 critérios patognomônico ou
	1 critério maior ou
	2 a 3 critérios menores ou
	História pessoal de BRRS

Para o diagnóstico de BRRS, ainda não há consenso internacional. É caracterizada por macrocefalia, máculas pigmentadas no pênis, lipomas, lesões hamartomatosas e polipose intestinal hamartomatosa. Em crianças, geralmente manifesta-se com déficit intelectual ou motor, alterações tireoideanas, malformações linfáticas e/ou vasculares, palato arqueado, escoliose, convulsões, miopatia por depósito de lípidos e hiperextensibilidade das articulações (8).

A síndrome Proteus é uma desordem de espectro variado, envolvendo hemi-hipertrofia, malformações congênitas, crescimento hamartomatoso de múltiplos tecidos, nevos conjuntivos e epidérmicos e hiperostose. Os pacientes que apresentam achados sugestivos de diagnóstico da síndrome Proteus, mas que não preenchem os critérios diagnósticos são denominados portadores da síndrome Proteus-like. (24).

Cerca de 5% dos casos de carcinomas de tireoide não medulares são caracterizados como familiares (FNMTC) (6). O FNMTC pode ser subdividido em 2 grupos:

- 1- Síndrômico: minoria dos casos, com locus já identificados, apresentam predisposição à associação de outros tumores, como o exemplo da Síndrome de Cowden.
- 2- Não síndrômico: maior parte dos tumores familiares, sem locus identificados, geralmente mais agressivos que os tumores esporádicos. Frequentemente acontecem em idades mais jovens, tendência à multicentricidade, invasão local, metástases linfonodais e recorrências frequentes.

Certos grupos tendem a preconizar tratamentos mais agressivos nos casos de FNMTC, incluindo esvaziamento cervical profilático do nível VI, radioiodoterapia e supressão do TSH, independentemente do tamanho do tumor, mas não é um consenso.

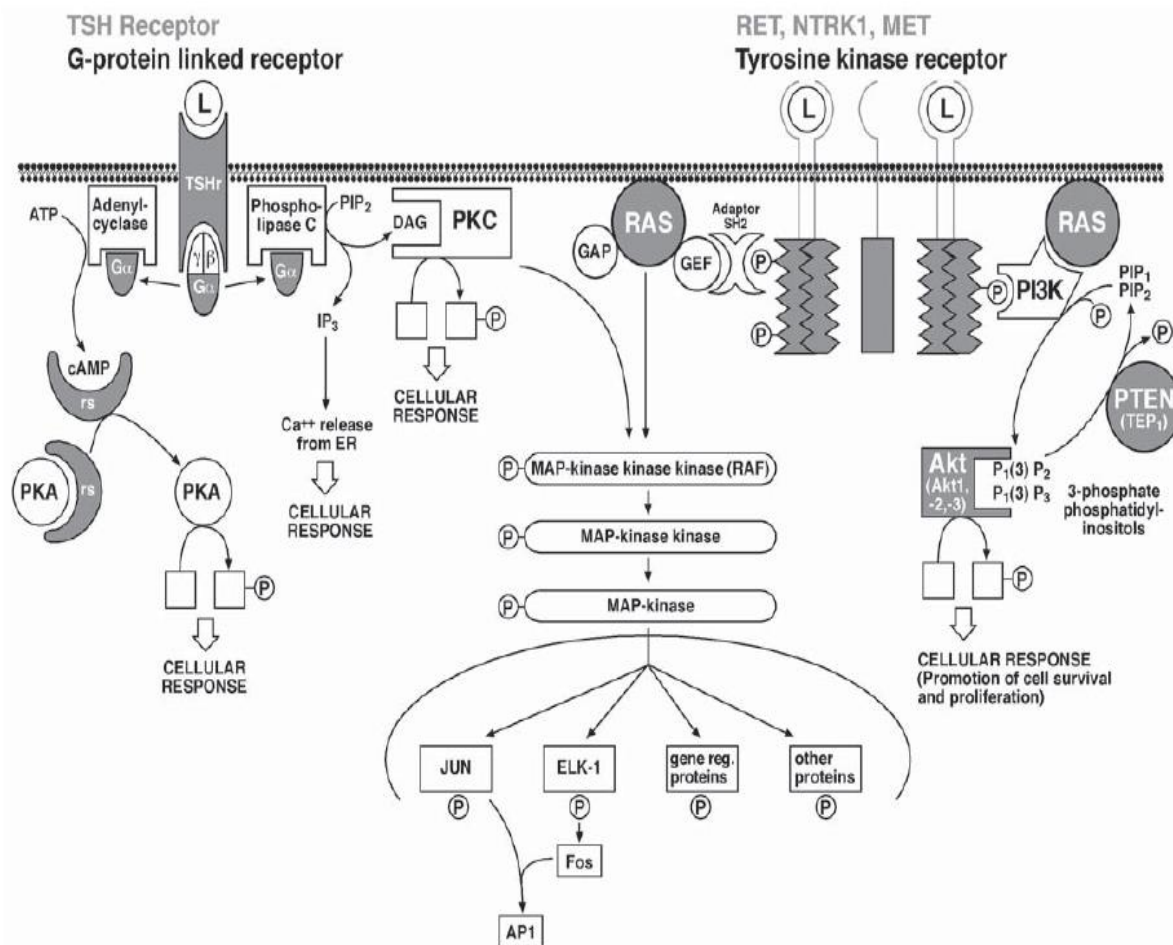
O rastreamento de neoplasias em portadores de PTHS deve ser iniciado aos 18 anos, com avaliação clínica anual direcionada à detecção de anormalidades cutâneas, mamárias, tireoideanas e endometriais. Exames complementares anuais

também devem ser considerados, sendo a mamografia obrigatória aos 30 anos, a ultrassonografia da tireoide a partir dos 18 anos e as ultrassonografias ginecológicas após os 35 anos, inclusive com biópsias endometriais. Em casos de câncer diagnosticado previamente na família, o rastreamento deve iniciar-se 5 anos antes da idade de diagnóstico do caso índice (20,22).

2.4- PTEN E TUMORIGÊNESE TIREOIDEANA PAPILAR

A via da MAPK é a principal via tumorigênica dos tumores papilares da tireoide, causando descontrolo na proliferação, invasão e apoptose celular (14,25).

Figura 4 – Alterações moleculares associadas a carcinogênese tireoideana. Via da MAPK e via PI3K/Akt.



As anormalidades genéticas tipicamente descritas nesse tipo histológico são as mutações somáticas ativadoras dos genes *BRAF*, *RAS* e o rearranjo *RET/PTC*. (17,26).

As mutações de *BRAF* e os rearranjos de *RET/PTC* estão presentes em mais de 70% dos casos (26). As mutações somáticas do *RAS* são encontradas em cerca de 10 % dos casos, ao contrário dos carcinomas foliculares e anaplásicos, que comumente manifestam tais mutações (27).

Entretanto, significativa proporção de carcinomas papilares não apresenta nenhuma dessas alterações genéticas, sugerindo que possa haver influência de outras vias de sinalização favorecendo o surgimento desses tumores (28).

O envolvimento da via PI3K/Akt na tumorigênese tireoideana têm sido muito estudado, principalmente em pacientes portadores de mutações do *PTEN*, gene que regula negativamente essa via.

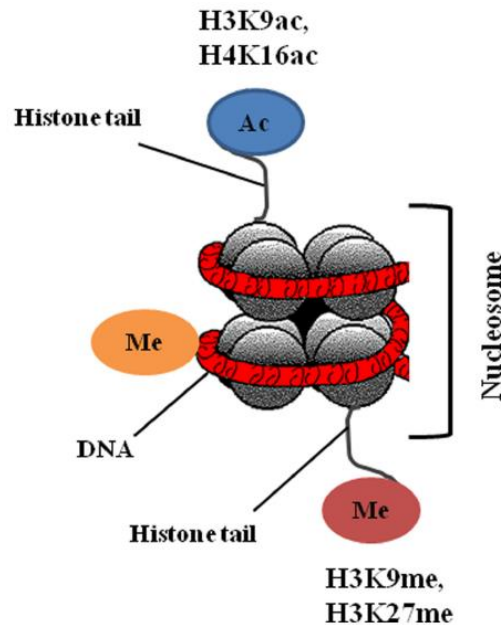
Entre as principais anormalidades genéticas encontradas, destacam-se o ganho de cópias do *PI3KCA* (27, 29) e as mutações germinativas do *PTEN* (5,9). Estas alterações correlacionam-se classicamente aos carcinomas foliculares e anaplásicos. Entretanto, mais recentemente, a histologia papilar foi encontrada em algumas séries de portadores de PTHS (8,26).

Embora mutações germinativas e somáticas do *PTEN* sejam raras em tumores papilares esporádicos, a ativação da via PI3K/AKT foi confirmada pela alta expressão de Akt nesses tumores (30,31). Foi também observada uma imunorreatividade reduzida da proteína PTEN em carcinomas papilares esporádicos (13). A discrepância entre alterações genéticas e ativação da via PI3K/Akt gerou estudos para avaliação de interferências epigenéticas na oncogênese tireoidiana.

O termo epigenético refere-se a alterações hereditárias na expressão gênica, sem alterações na sequência de DNA. O processo epigenético regula a expressão gênica, distinta nos vários tecidos através da manutenção ou não da condensação da cromatina. O termo epigenoma denomina a situação epigenética momentânea que explica como um único genoma eucariótico pode expressar-se distintamente em células de diferentes tecidos ou em diferentes estágios de desenvolvimento em um mesmo tecido (32).

Os mecanismos epigenéticos mais comuns são a as modificações de histona, a metilação do DNA e os microRNAs (32,33,34).

Figura 5 – Principais alterações epigenéticas em câncer: modificações da histona e metilação do DNA



FONTE: *Front Endocrinol* 2012;3(40):3

As principais modificações da histona são a acetilação e a metilação, que podem acarretar ativação ou repressão gênica, dependendo dos resíduos modificados e do tipo dessas modificações. Afetam a conformação da cromatina e influenciam a transcrição gênica. Poucos estudos foram conduzidos para investigar seu papel carcinogênico na tireoide (32,33).

A metilação do DNA é caracterizada pela adição de um grupo metil no quinto carbono de um resíduo de citosina num dinucleotídeo CpG e resulta em remodelação da cromatina. Associa-se ao silenciamento do gene através do recrutamento de repressores transcricionais ligadores do grupo metil do DNA ou do bloqueio de fatores transcricionais ligantes do DNA (34,35).

É um importante mecanismo de regulação da expressão gênica, principalmente durante a embriogênese. A metilação aberrante é frequentemente observada em condições patológicas como o câncer e acomete genes supressores de tumores (34).

Tumores benignos e malignos da tireoide podem sofrer metilação de genes supressores tumorais. O acometimento de tumores benignos pressupõe seu papel inicial na tumorigênese tireoideana (36).

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificadoras que agem como reguladores negativos da expressão de genes codificadores de proteínas envolvidos em processos como apoptose, proliferação celular, resposta imune e hematopoiese (32).

3. OBJETIVOS

3.1- Avaliar a expressão da proteína PTEN em tecido tireoideano normal e em carcinomas papilares esporádicos da tireoide.

3.2- Correlacionar a expressão imunohistoquímica da proteína PTEN às características clínicas, histológicas e ao comportamento biológico dos carcinomas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Mário Penna sob o parecer número 074/2011.

Em coorte retrospectivo, foram selecionados consecutivamente 46 pacientes em acompanhamento no ambulatório de câncer de tireoide do Hospital Mário Penna desde 2008, submetidos a tireoidectomia total, com diagnóstico histopatológico de carcinoma papilar de tireoide clássico ou variante folicular.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) pelos pacientes, foram coletados dos prontuários os seguintes dados: idade ao diagnóstico, sexo, história familiar, concomitância de bócio multinodular, multicentricidade, estadiamento e risco de mortalidade de acordo com o TNM, estado atual de atividade da doença, bem como exames complementares como tireoglobulina, anticorpo antitireoglobulina, ultrassonografia cervical, e na maioria dos casos pesquisa de corpo inteiro com I¹³¹ (anexo 2).

Os tumores foram randomizados de acordo com o tamanho, tipo histológico e agressividade tumoral. Os microcarcinomas mediam 1 cm ou menos e os macrocarcinomas mediam mais que 1 cm. Os tipos histológicos foram classificados como carcinoma papilar clássico e carcinoma papilar variante folicular. Os tumores agressivos caracterizavam-se pela presença de metástases linfonodais, invasão angiovascular ou extensão extratireoideana e os indolentes pela ausência de tais características. Nenhum paciente apresentava metástases a distância.

Os blocos parafinados com as amostras cirúrgicas foram submetidos a cortes, corados com hematoxilina e eosina e avaliados por uma única patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG.

A avaliação histológica foi realizada em microscópio óptico comum, sendo os carcinomas papilares classificados de acordo com os critérios diagnósticos da OMS (1988) (37).

Subsequentemente, foram confeccionadas lâminas com cortes de 4 micras e submetidas a imunohistoquímica (13,38).

Os cortes das amostras foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol.

Depois, foram tratados com solução de H₂O₂ a 3%, fundamental na inativação da peroxidase endógena e novamente lavados em tampão PBS.

A seguir, foram mergulhados em solução de EDTA 1mM (pH 8,0), e aquecidos a 960° C em vaporizador steamer por 45 minutos, para a recuperação antigênica.

Após resfriamento e lavagem dos cortes em tampão PBS, permaneceram em repouso no leite por 15 minutos.

Nova lavagem com PBS foi feita para que, em seguida, os cortes fossem incubados com o anticorpo primário anti-*PTEN*. Para controle negativo da imunomarcação, foi utilizado apenas PBS.

Essa incubação durou 30 minutos em câmara úmida a 4° C. Após lavagem em PBS, as secções foram expostas à solução pós-primária, kit NovoLink™ Max Polymer (Novocastra, Reino Unido).

Nova lavagem precedeu a exposição dos cortes ao polímero, kit NovoLink™ Max Polymer, imprescindível para a amplificação da resposta.

A imuno-reação foi visualizada usando diaminobenzidina - DAB, kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Estados Unidos), que foi preparado de acordo com as orientações do fabricante.

Ao final, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados e montados.

Todos os cortes foram examinados em um microscópio de luz (Modelo KF2, Zeiss, GE), sob o aumento de 400x e 1000 x para quantificar a intensidade de imunexpressão da proteína.

Múltiplos campos de cada lesão e de tireoide normal foram analisados pela mesma patologista, considerando-se a coloração nuclear. A coloração para *PTEN* foi avaliada de acordo com presença de células positivas para as proteínas por campo.

Foram consideradas positivas as células que apresentaram o núcleo com coloração castanha, como resultado da precipitação do cromógeno diaminobenzidina. De acordo com a literatura, a proteína PTEN se expressa fortemente no epitélio folicular normal, particularmente no núcleo e em menor grau no citoplasma. Os adenomas foliculares apresentam coloração nuclear mais fraca e coloração citoplasmática similar ao tecido normal. A coloração nuclear e citoplasmática muito reduzidas ou ausentes são encontradas nos carcinomas. Os tumores indiferenciados normalmente não demonstram coloração nuclear ou citoplasmática (13).

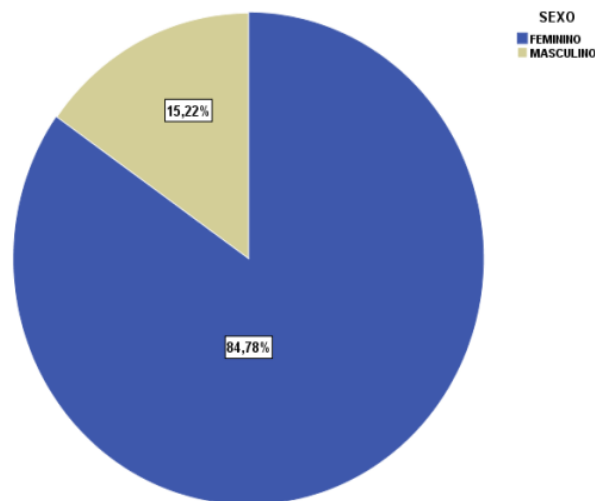
A classificação dos tecidos foi realizada de acordo com a intensidade da coloração, graduada em cruzes (0), ausência; (+), fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++), fortemente positivo), comparativamente ao tecido tireoideano normal adjacente. O controle negativo, visando excluir coloração inespecífica, foi feito pela omissão do anticorpo primário.

Os dados foram analisados através da estatística descritiva e através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis para avaliar diferenças significativas entre os grupos. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A amostra observada é formada por 84,8% de pacientes do sexo feminino e 15,2% do sexo masculino.

Gráfico 1 – Distribuição dos pacientes por sexo



A idade média dos pacientes à época do diagnóstico de câncer foi 47,3 anos com desvio-padrão de 14,3. O paciente mais novo tinha 22 anos e o mais velho 81 anos.

Apenas 4,3% dos pacientes apresentavam história familiar positiva para câncer de tireoide.

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes por histórico familiar de câncer de tireoide

Histórico Familiar	Frequência	Percentual
Sim	2	4,3
Não	44	95,7
Total	46	100,0

A concomitância de bócio multinodular foi descrita em 37% dos pacientes.

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes por presença de bócio multinodular

Bócio Multinodular	Frequência	Percentual
Sim	17	37,0
Não	29	63,0
Total	46	100,0

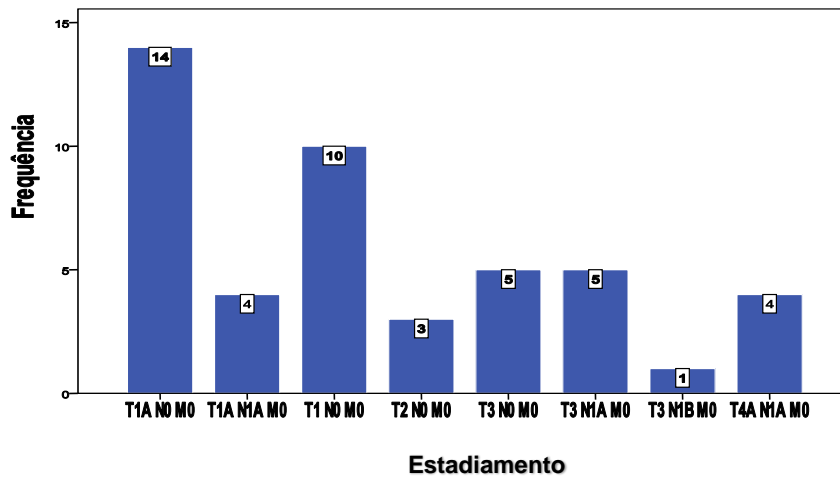
O tumor foi classificado como multicêntrico em 26,1% dos casos.

Tabela 4 – Distribuição dos pacientes de acordo com multicentricidade do tumor

Multicêntrico	Frequência	Percentual
Não	34	73,9
Sim	12	26,1
Total	46	100,0

O estadiamento dos tumores segundo o TNM pode ser observado no gráfico 3, sendo a maioria dos pacientes classificada nos estádios I e II (39,40).

Gráfico 3 – Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento do tumor (TNM)



O risco de mortalidade por câncer de tireoide, estimado pela classificação do TNM foi muito baixo ou baixo em 84,7% pacientes e alto em 15,2 %.

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes por risco de mortalidade

Risco de Mortalidade	Frequência	Percentual
Alto	7	15,2
Baixo	25	54,3
Muito Baixo	14	30,4
Total	46	100,0

A maioria dos pacientes apresentava-se sem evidências de doença em atividade.

Tabela 6 – Distribuição dos pacientes por estado atual da doença

Estado da Doença	Frequência	Percentual
Ativo	12	26,1
Livre	34	73,9
Total	46	100,0

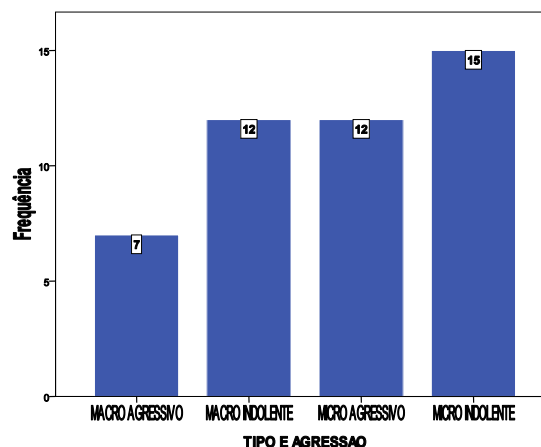
Em relação à histologia, 56,5% foram diagnosticados com carcinoma papilar clássico e 43,5% com carcinoma papilar variante folicular.

Tabela 7 – Distribuição dos pacientes por histologia

Histologia	Frequência	Percentual
Papilar Clássico	26	56,5
Papilar Variante Folicular	20	43,5
Total	46	100,0

De acordo com o tamanho e a agressividade tumoral, 32,6% eram microcarcinomas indolentes, 26,1% microcarcinomas agressivos, 26,% macrocarcinomas indolentes e 15,2% macrocarcinomas agressivos.

Gráfico 4 – Distribuição dos pacientes de acordo com o tamanho e agressividade tumoral

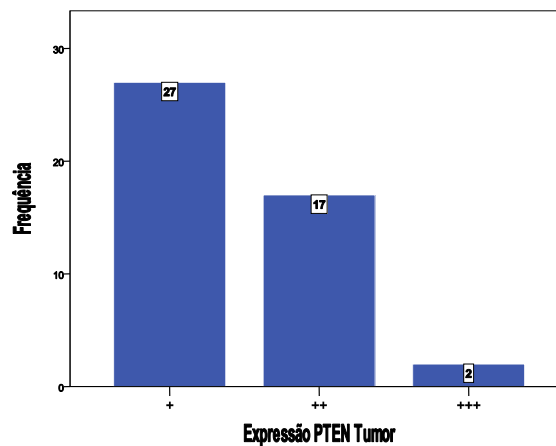


A expressão imunohistoquímica do gene *PTEN* foi analisada nesse estudo. Conforme a metodologia relatada previamente, a expressão de *PTEN* foi graduada de 0 a +++ , de acordo com a intensidade da coloração nuclear das células.

Todos os 46 pacientes apresentaram graduação fortemente positiva (+++) na avaliação de expressão de *PTEN* no tecido tireoideano normal. Nos carcinomas, a

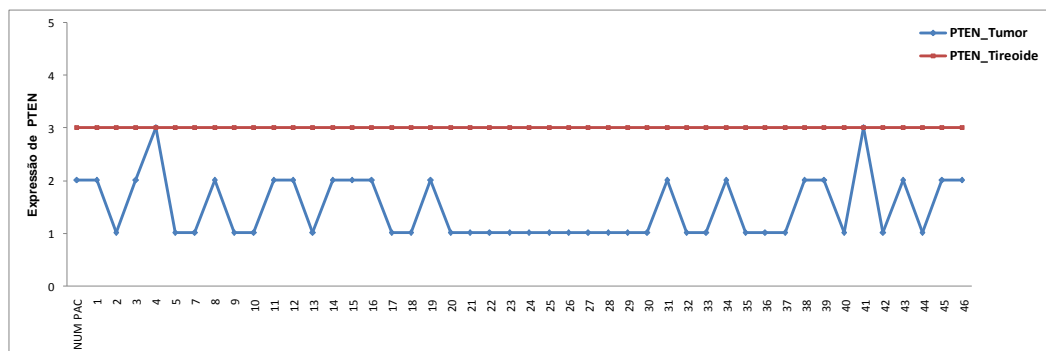
expressão de PTEN foi quantificada como fracamente positiva (+) em 58,7% dos pacientes, moderadamente positiva (++) em 37% dos pacientes e fortemente positiva (+++) em apenas 2 pacientes (4,3%). Nenhum paciente deixou de expressar a proteína.

Gráfico 5 – Distribuição dos pacientes de acordo com os valores da Expressão de PTEN nos carcinomas



Na maioria dos casos, a proteína PTEN foi menos expressa no tecido tumoral quando comparada ao tecido tireoideano normal.

Gráfico 6 – Intensidade da expressão de PTEN no tecido tumoral e no tecido tireoideano normal por paciente



Os registros fotográficos demonstram a marcante hipoexpressão da proteína PTEN nos tecidos tumorais em comparação aos tecidos tireoideanos normais.

Figura 6 – Expressão imunohistoquímica de PTEN no tecido tireoideano normal (400 X) em amostra com expressão fortemente positiva (+++)

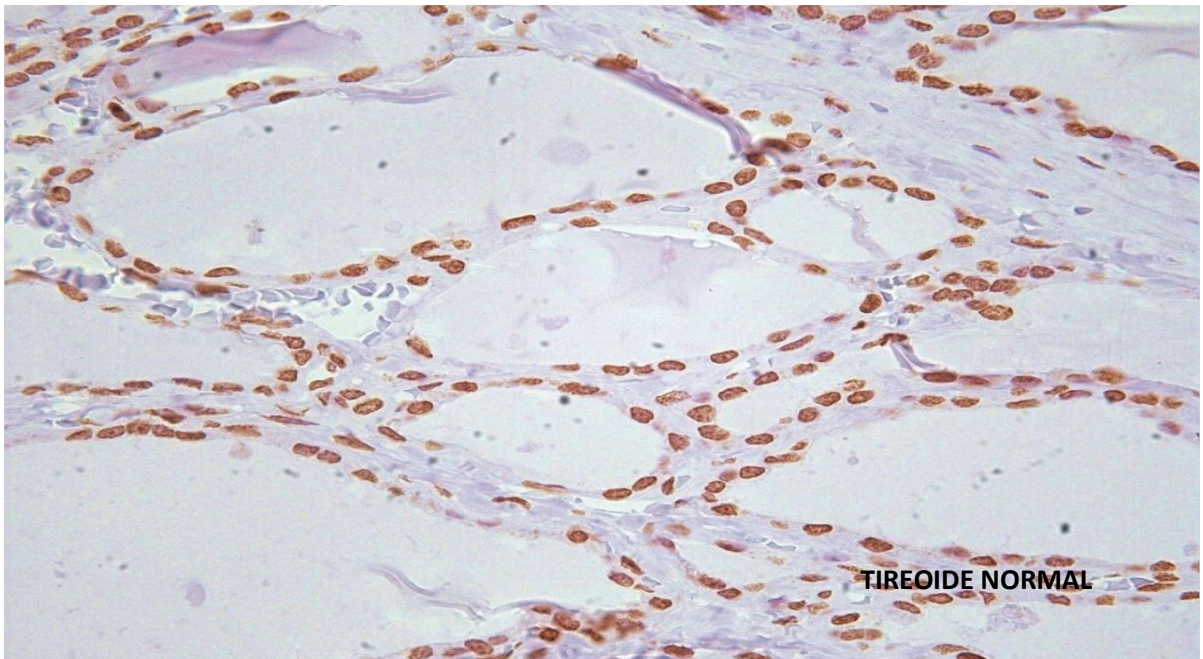


Figura 7 – Expressão imunohistoquímica de PTEN no carcinoma papilar (400 X) em amostra com expressão fracamente positiva (+)

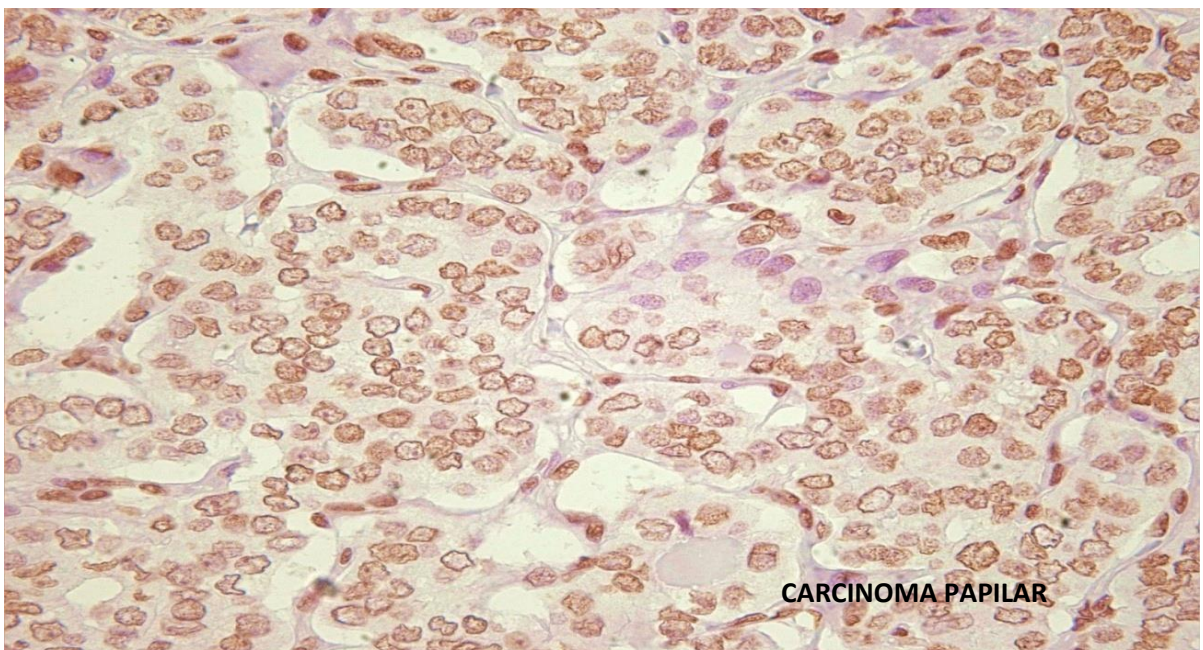


Figura 8 – Expressão imunohistoquímica de PTEN no tecido tireoideano normal (1000 X) em amostra com expressão fortemente positiva (+++)

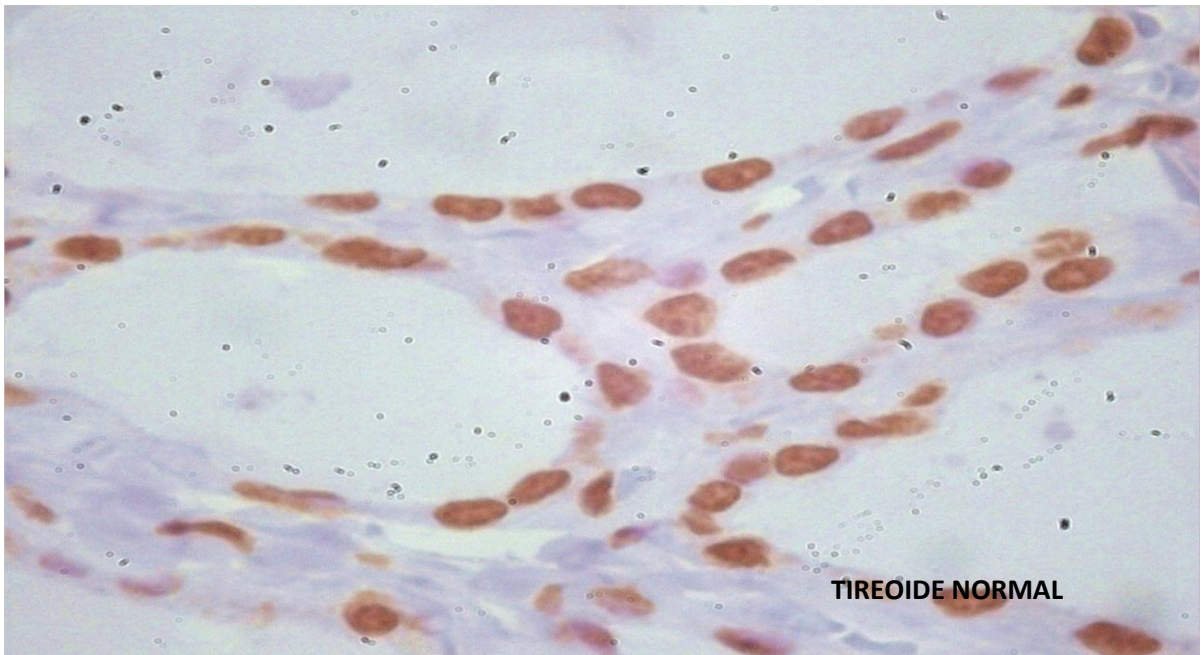


Figura 9 – Expressão imunohistoquímica de PTEN no carcinoma papilar (1000 X) em amostra com expressão fracamente positiva (+)

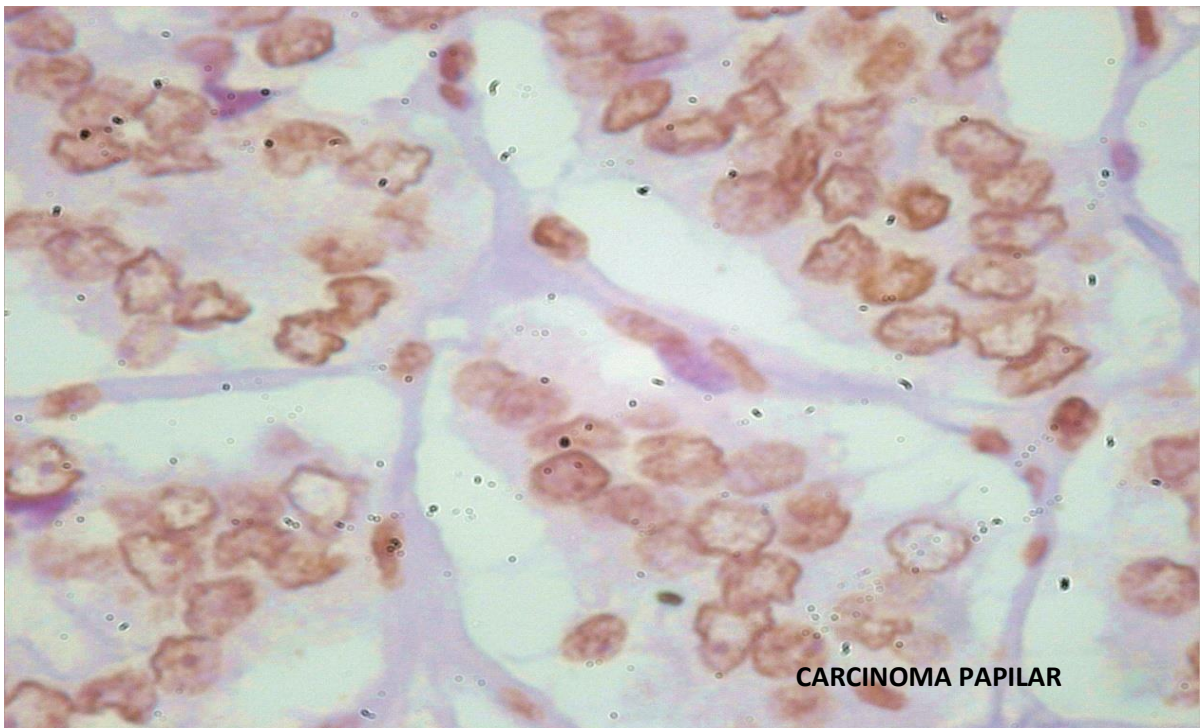
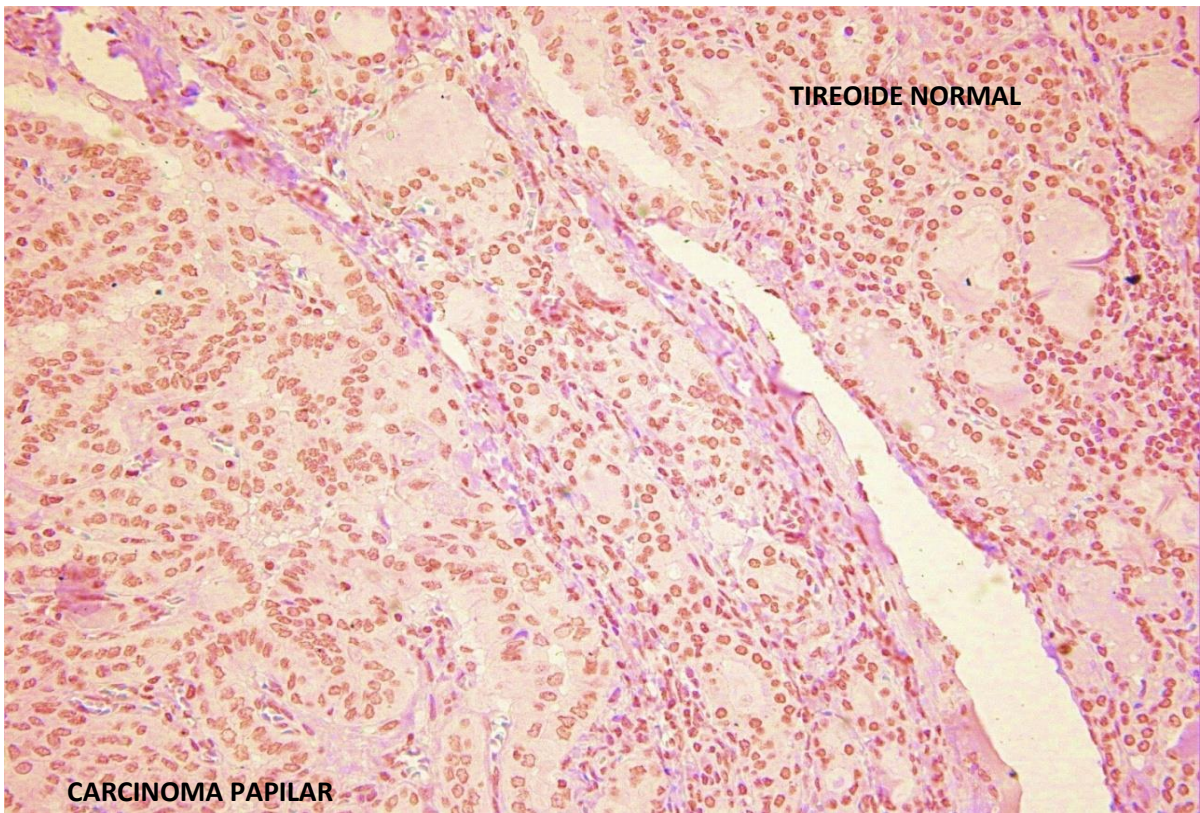
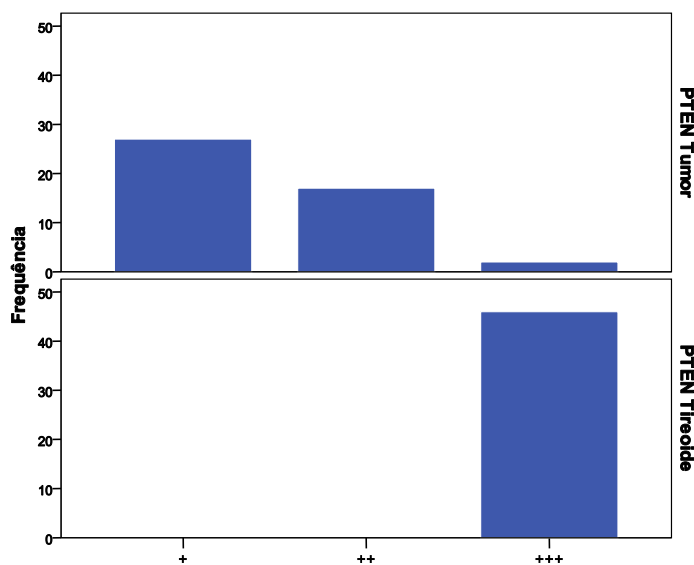


Figura 10 – Expressão imunohistoquímica de PTEN no carcinoma papilar com expressão fracamente positiva e tecido tireoideano normal com expressão fortemente positiva (200X)



A diferença de intensidade da expressão da proteína PTEN no tecido tumoral e no tecido tireoideano normal alcançou significância estatística, com $p < 0,000$.

Gráfico 7- Distribuição dos pacientes de acordo com os valores da Expressão de PTEN no tumor e no tecido tireoideano normal



Não houve diferença estatisticamente significativa entre a hipoexpressão do *PTEN* nos carcinomas papilares clássicos e nas variantes foliculares, com $p=0,209$.

Tabela 8 – Distribuição dos pacientes de acordo com valores da expressão de *PTEN* no tecido tumoral, por Histologia

Valor <i>PTEN</i> (em nº de cruces)	Histologia		Total	p-valor
	Papilar Clássico	Papilar Variante Folicular		
+	17	10	27	
++	9	8	17	
+++	-	2	2	0,209
Total	26	20	46	

A expressão do *PTEN* no tecido tumoral não diferiu entre os microcarcinomas e os macrocarcinomas, com $p = 0,206$.

Tabela 9 – Distribuição dos pacientes de acordo com valores da expressão de *PTEN* no tecido tumoral, por tamanho

Valor <i>PTEN</i> (em nº de cruces)	Tamanho		Total	p-valor
	Micro	Macro		
+	18	9	27	
++	8	9	17	
+++	1	1	2	0,206
Total	27	19	46	

Não houve diferença estatística na expressão de *PTEN* entre tumores agressivos e indolentes, sendo o $p=0,211$.

Tabela 10 – Distribuição dos pacientes de acordo com os valores de Expressão de *PTEN* no tecido tumoral e agressividade

Valor <i>PTEN</i> (em nº de cruces)	Agressividade		Total	p-valor
	Indolente	Agressivo		
+	14	13	27	
++	11	6	17	
+++	2	-	2	0,211
Total	27	19	46	

Considerando simultaneamente o tamanho e a agressividade tumoral, também não houve diferença significativa entre os grupos, com $p=0,401$.

Gráfico 8 – Distribuição dos pacientes de acordo com os valores de Expressão de PTEN no tecido tumoral, tamanho e agressividade

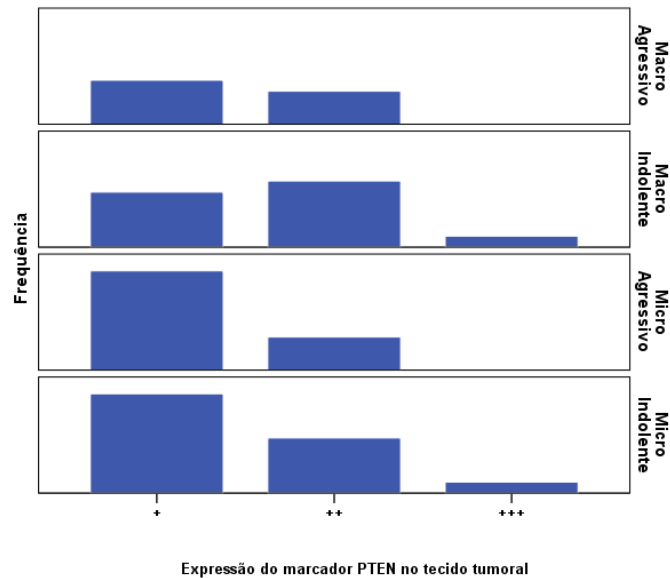


Tabela 11 – Distribuição dos pacientes de acordo com os valores de Expressão de PTEN no tecido tumoral, tamanho e agressividade

Valor PTEN (em nº de cruces)	Tamanho e Agressividade				Total	p-valor
	Macro	Macro	Micro	Micro		
	Agressivo	Indolente	Agressivo	Indolente		
+	4	5	9	9	27	
++	3	6	3	5	17	
+++	-	1	-	1	2	0,401
Total	7	12	12	15	46	

A expressão do *PTEN* não se correlacionou estatisticamente com o estado atual da doença, com $p=0,165$.

Tabela 12 – Distribuição dos pacientes de acordo com os valores de Expressão de PTEN no tecido tumoral e estado atual da doença

Valor PTEN (em nº de cruces)	Estado atual da doença		Total	p-valor
	Livre	Ativo		
+	18	9	27	
++	14	3	17	
+++	2	-	2	0,165
Total	34	12	46	

Os diferentes riscos de mortalidade por carcinoma da tireoide determinados pelo TNM em relação à expressão do *PTEN* apresentaram $p=0,925$, não sendo significativos.

Tabela 13 – Distribuição dos pacientes de acordo com os valores de Expressão de PTEN no tecido tumoral e risco de mortalidade (TNM)

Valor PTEN (em nº de cruces)	Riscos de Mortalidade			Total	p-valor
	Muito Baixo	Baixo	Alto		
+	9	14	4	27	
++	4	10	3	17	
+++	1	1	-	2	0,925
Total	14	25	7	46	

6. DISCUSSÃO

Acredita-se que o processo de carcinogênese resulte do acúmulo de múltiplas alterações gênicas, levando à hiperexpressão de um oncogene ou a perda de função de um gene supressor de tumor. De acordo com esse modelo, uma única célula transformada ganha uma vantagem de replicação clonal devido a perda dos mecanismos de regulação da proliferação celular (4).

O papel dos proto-oncogenes na carcinogênese dos CPT está amplamente estudado. Mutações em ponto do gene *BRAF* e rearranjo do protooncogene *RET* propiciam a ativação da via MAP-Kinase e são as alterações gênicas mais prevalentes no CPT (19).

Recentemente, o papel dos genes supressores de tumor passou a ser também estudado. Alterações da expressão de genes localizados em sítios frágeis cromossômicos (41,42) e anormalidades teloméricas vêm sendo relatados em CPT esporádicos e familiares (43).

O envolvimento tireoideano é frequentemente observado nos portadores de mutações do *PTEN*, podendo inclusive preceder o diagnóstico. Uma metanálise recente ressaltou a prevalência de 53% de doenças tireoideanas em portadores de CS, com predominância de patologias benignas, muitas vezes concomitantes (21). A incidência de tumores malignos é estimada em 10 %, classicamente representados por carcinomas de histologia folicular. Os carcinomas anaplásicos também são associados às mutações de *PTEN* (27).

Apesar de incomum, o envolvimento do *PTEN* na carcinogênese papilar tem sido reportado, com crescentes relatos de tumores relacionados a anormalidades genéticas e, principalmente, epigenéticas, tanto em tumores germinativos quanto em tumores esporádicos (12,44,45).

Harach e colaboradores destacaram os adenomas foliculares e os bócios adenomatosos múltiplos como as lesões tireoideanas mais comuns em CS (46). Laury et al confirmaram esses achados, citando também a ocorrência de tireoidite linfocítica e hiperplasia de células C (47), além dos carcinomas diferenciados.

Inesperadamente, demonstraram a incidência superior de CPT em relação ao CFT, observados respectivamente em 60% e 45 % dos casos (8).

A pesquisa de Barletta et al em 8 pacientes portadores de CS também demonstrou maior prevalência de carcinomas papilares (63%) do que de foliculares (25%), sendo que metade dos tumores papilares eram microcarcinomas (10).

A representatividade do carcinoma papilar em crianças foi notável num estudo prospectivo, multicêntrico, com 2723 pacientes portadores de CS, estando este presente em todos os pacientes com diagnóstico de câncer de tireoide com idade inferior a 18 anos. Os pacientes adultos tiveram predomínio de carcinomas foliculares (48). Smith e colaboradores também constataram o desenvolvimento de carcinomas papilares e foliculares em crianças portadoras da mutação de *PTEN* (49).

A associação entre mutações germinativas do *PTEN* e o desenvolvimento de tumores da tireoide em portadores de PTHS é bem estabelecida, entretanto, até recentemente poucos estudos avaliaram a ocorrência dessas mutações em tumores esporádicos. O grupo de Nagy demonstrou a mínima frequência de mutações germinativas em 259 pacientes com tumores diferenciados esporádicos da tireoide, com achado de mutações em apenas 2 casos (0,8%), ambos portadores de carcinomas foliculares (23). Dahia e colaboradores detectaram apenas uma mutação num grupo de noventa e cinco pacientes com tumores tireoidianos esporádicos (39 papilares, 12 foliculares, 9 anaplásicos, 5 carcinomas de Hurthle, 21 adenomas foliculares e 9 adenomas de Hurthle) em um carcinoma papilar (12).

O aumento do relato de tumores papilares esporádicos em detrimento à baixa frequência de mutações nesses tumores justifica a análise da expressão gênica do *PTEN* nos tecidos tumorais. A imunohistoquímica é a melhor ferramenta para avaliar a perda de expressão da proteína PTEN decorrente de alterações moleculares genéticas ou epigênicas.

A maioria dos estudos, inclusive o nosso, utiliza um escore de expressão imunohistoquímica graduado em cruces, de acordo com a intensidade da coloração e/ou a porcentagem de células coradas. Criticamente, este critério pode apresentar

variações de interpretação por examinadores diferentes, requerendo a padronização de critérios mais reprodutíveis (38).

Todos os tecidos acometidos nos pacientes portadores de PTHS demonstram alterações de expressão de PTEN. Zhou e colaboradores identificaram a ausência ou diminuição da expressão de PTEN em gangliocitomas displásicos de pacientes adultos com doença de Lhermitte-Duclos do adulto (LDD) e Huang et al em pólipos hamartomatosos gastrointestinais (50).

Na tireoide, a hipoexpressão de PTEN no tumor em relação ao tecido normal é descrita (13,50). Nosso estudo confirmou esse achado pois, a maioria dos pacientes (95,7%) hipoexpressou a proteína PTEN nos carcinomas em comparação ao tecido tireoideano normal, com significância estatística ($p < 0,000$). Conforme esperado, a perda completa da expressão de PTEN não foi averiguada em nenhum dos nossos casos, visto tratar-se de característica comum aos tumores indiferenciados e anaplásicos, com baixa incidência em tumores diferenciados (menos de 10%) (44).

Algumas séries reportam a expressão reduzida de PTEN nos carcinomas esporádicos, mesmo na ausência de mutações ou deleções do gene, sugerindo a participação na tumorigênese por vias epigenéticas (13,44).

Alvarez-Nunes et al, fundamentados por esta discrepância, compararam a frequência da hipermetilação do promotor do DNA do *PTEN* em tumores esporádicos de tireoide comparados a tecidos normais. Houve metilação do promotor em 59% dos tumores e nenhuma amostra de tecido normal foi afetada. A frequência da metilação dessa série superou a presença de mutações ou de perda de heterozigose reportados previamente. A imunohistoquímica negativa para PTEN foi significativamente associada à presença da hipermetilação, especialmente nos tumores foliculares. Embora o acometimento folicular tenha sido mais prevalente, a hipermetilação do *PTEN* foi notada em 45,7% dos carcinomas papilares, cogitando a participação do *PTEN* no desenvolvimento de tumores tireoideanos, independentemente do tipo histológico (44).

A inativação do PTEN é um dos mecanismos de ativação da via PI3K (51). Sozopoulos e colaboradores verificaram a ativação da via PI3K/Akt em 83 pacientes

gregos com carcinoma papilar de tireoide esporádicos (30). Essa ativação também foi constatada em carcinomas papilares da população do leste Europeu, mesmo na ausência de mutações (31).

Na maioria dos casos, alterações genéticas adicionais são indispensáveis para que a via PI3K seja ativada (29). A maioria dos carcinomas indiferenciados e anaplásicos da tireoide apresentam alterações genéticas nas vias da MAPK e PI3K, sendo a última preferencialmente ativada nesses tumores (27,51). Estudos recentes especulam o papel da ativação concomitante das duas vias na progressão de carcinoma diferenciado da tireoide em CAT e em CPT recorrentes (51).

Este modelo somatório fora previamente identificado em outros tipos tumorais como o melanoma, ativado pela via PI3K/Akt mediante o silenciamento do *PTEN* e pela via da MAPK, pela expressão do *BRAF* mutante, gerando um tumor mais agressivo (14).

Contudo, esse estudo não estabeleceu correlação entre a agressividade tumoral e a expressão da proteína PTEN. A agressividade tumoral foi caracterizada pela presença de metástases linfonodais, invasão angiovascular ou extensão extratireoideana. Os tumores indolentes e agressivos tiveram expressão de PTEN semelhante, com expressão fraca ou moderada na maioria dos casos. Apesar de considerados agressivos, grande parte dos pacientes foi classificada em estadios I e II do TNM, com alto risco de mortalidade em apenas 15,3 % dos pacientes. Paralelamente, mais de 70% dos casos não apresentam doença em atividade, sugerindo tratar-se de um grupo de pacientes de bom prognóstico, cursando com evolução típica de pacientes de carcinomas diferenciados.

Em relação ao tamanho do tumor, mais da metade de nossa amostra foi composta de microcarcinomas. Curiosamente, 44,4% dos microcarcinomas foram considerados agressivos, contrariando o típico caráter indolente desses tumores (25,52). Demonstrou-se padrão similar de expressão entre os micro e macrocarcinomas, independente do grau de agressividade.

Considerando o carcinoma papilar variante folicular como um tumor de características clínicas e moleculares intermediárias entre os papilares e foliculares, a probabilidade de maiores alterações de expressão do PTEN nesse tipo histológico seria esperada (53). Contudo, não demonstramos diferença significativa entre a expressão de PTEN nos carcinomas papilares clássicos e nas variantes foliculares.

Devido à abordagem exclusiva da expressão proteica do PTEN, o mecanismo de ação na carcinogênese não pode ser esclarecido nesse estudo. Presume-se que haja predominância dos eventos epigenéticos como a metilação do DNA, mediante relatos de baixa frequência de mutações e deleções em tumores papilares esporádicos (12,44).

A metilação é um fenômeno tumorigênico reconhecido em vários tumores, inclusive nos tireoideanos.

Figura 11: Principais modificações epigenéticas em câncer de tireoide

	Gene	Reference
Genes involved in control of proliferation and invasion	p16INK4A	Elisei et al. (1998)
	RASSF1A	Schagdarsurenjin et al. (2002)
	PTEN	Alvarez-Nuñez et al. (2006)
	Rap1GAP	Zuo et al. (2010)
	TIMP3	Hoque et al. (2005), Hu et al. (2006)
	DAPK	
	RAR β 2	
Thyroid-specific genes	E-cadherin	Graff et al. (1998), Wiseman et al. (2006)
	CITED1	Sassa et al. (2011)
	Na ⁺ /I ⁻ symport	Xing (2007a), Xing (2007b)
	TSH receptor	
	pendrin	
	SLC5A8	
	TTF-1	Kondo et al. (2009)

FONTE – *Front Endocrinol* 2012;3(40):3

Genes supressores de tumores como o *TIMP3*, *SLC5A8* e o *DAPK* metilados têm papel bem estabelecido na tumorigênese do CPT, associando-se a comportamento agressivo, com invasão extratireoideana, metástases linfonodais e

multicentricidade (54). A metilação do *NIS* e do *TSH-R* comprometem a captação do radioiodo, piorando o prognóstico do CDT (33).

A metilação do *PTEN* e do *RASSF1A* (ras association domain family number 1) predominam em CFT. Ambos são moduladores da via PI3K/AKT e participam ativamente na tumorigênese nesse tipo histológico (33).

Stephen ET AL, no intuito de identificar marcadores de metilação de DNA para detecção precoce do câncer de tireoide, examinaram a metilação em 24 genes supressores tumorais. Os genes mais frequentemente metilados foram o *CASP8*, o *RASSF1* e o *NIS* (54).

Hou e colaboradores examinaram 143 tumores, incluindo 42 bócios adenomatosos, 65 carcinomas foliculares e 36 carcinomas anaplásicos da tireoide. Reportaram hipermetilação quantitativamente progressiva em adenomas, CFT e CAT, corroborando a hipótese de progressão tumoral dessas linhagens. Concomitantemente, perceberam que anormalidades genéticas como ganho de cópias e mutações de *PI3KCA* e mutações de *Ras* também prevaleciam em CAT, encontrando significativa associação entre as principais alterações genéticas da via PI3K/Akt e a metilação do *PTEN*, atribuindo relação causal entre as alterações genéticas e epigenéticas. (36).

A discrepância da frequência de mutações e deleções hemizigóticas no grupo composto por adenomas foliculares, carcinomas foliculares e papilares (20 a 30%) e no grupo de carcinomas anaplásicos (60%) em outro estudo também sugerem o silenciamento epigenético do *PTEN* na progressão tumoral (26).

O conhecimento de novas vias tumorigênicas é fundamental para o desenvolvimento de novos tratamentos com alvos moleculares distintos, principalmente em pacientes que evoluem com tumores muito agressivos e refratariedade ao tratamento convencional.

Vários estudos experimentais têm sido conduzidos neste âmbito, testando drogas como inibidores de PI3K, de Akt, de receptores de tirosinoquinase e de mTOR em células sem expressão de PTEN (16). A inibição farmacológica de mTOR preveniu a formação de inúmeros tumores em ratos *Pten*^{+/-} (55).

Dima et al desenvolveram linhagens celulares derivadas de carcinomas pouco diferenciados de ratos duplos-mutantes $Kras^{G12D}/Pten^{-/-}$ e demonstraram que o tratamento dessas células com inibidores de MEK1, PI3K ou mTOR resultou em inibição parcial do crescimento celular, enquanto a inibição dupla promoveu a morte celular (56). Jin e colaboradores também realizaram estudos pré-clínicos com dupla inibição de MAPK e mTOR, induzindo resposta citostática superior ao uso isolado de cada inibidor (57).

Os agentes demetilantes têm papel promissor nos tumores com alterações epigenéticas. Agentes como a decitabina foram eficazes em restaurar a expressão dos genes *NIS* e *TSH-R* em linhagens celulares de tumores de tireoide (58). Encontra-se em andamento um estudo clínico em fase II visando avaliar o potencial da decitabina em recuperar a capacidade de captação de I^{131} em pacientes com carcinomas de tireoide metastáticos não captantes (32).

Inibidores da histona deacetilase como a depsipeptida e vorinostat também tem sido testados em carcinomas de tireoide, ainda em fases clínicas iniciais. O ácido valpróico demonstrou previamente a capacidade de expressão do *NIS* em carcinomas indiferenciados de tireoide e seu efeito sinérgico a agentes citotóxicos no tratamento desses tumores tem sido avaliado (32).

Em suma, o avanço no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese tireoideana implica em novas perspectivas para a abordagem dos portadores de carcinomas, principalmente dos que evoluem de maneira insatisfatória. O desenvolvimento de novos estudos é fundamental para sedimentar os conhecimentos atuais e para favorecer novas descobertas.

7. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo sugerem a presença de anormalidades funcionais do *PTEN*, caracterizadas pela hipoexpressão da proteína PTEN nos carcinomas papilares esporádicos da tireoide em comparação ao tecido tireoideano normal, demonstrando a possível coparticipação da via PI3K/Akt na tumorigênese desse tipo histológico.

Não houve correlação entre a expressão de PTEN e as variantes sugestivas de agressividade tumoral, impedindo a caracterização do *PTEN* como preditor de agressividade.

A metodologia do estudo não permite detectar o mecanismo de gênese da anormalidade do *PTEN* ou mesmo sua interferência em relação ao comportamento biológico do tumor, requerendo mais estudos para esclarecimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Nelen MR, Padberg GW, Peeters EAJ, Lin AY, van den Helm B, Frants RR, Coulon V, Goldstein AM, van Reen MMM, Easton DF, Eeles RA, Hodgson S, Mulvihill JJ, Murday VA, Tucker MA, Mariman ECM, Starink TM, Ponder BAJ, Ponder BAJ, Ropers HH, Kremer H, Longy M, Eng C. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nature genetics* 1996;13:114-116.
- 2- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Alfred Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHF, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumor suppressor gene, *MMAC1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat genet* 1997;15:356-362.
- 3- Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PD. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* 2011;11:289-301.
- 4- Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(4):351-360.
- 5- Eng C. Cowden Syndrome. *J genet counsel* 1997;6(2):181-192.
- 6- Khan A, Smelie J, Nutting C, Harrington K, Newbold K. Familial nonmedullary thyroid cancer: a review of the genetics. *Thyroid* 2010;20(7):795-801.
- 7- Tan MH, Mester JL, Ngeowl J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res* 2012;18(2):400-407.
- 8- Laury AR, Bongiovanni M, Tille JC, Kozakewich H, Nosé V . Thyroid pathology in PTEN-hamartoma tumor syndrome: characteristic findings of a distinct entity. *Thyroid* 2011;21(2):135-144.
- 9- Harb WJ, Sturgis EM. Differentiated thyroid cancer associated with intestinal polyposis syndromes: a review. *Head and Neck* 2009;31:1511-1519.
- 10-Barletta JA, Belizzi AM, Hornick JL. Immunohistochemical staining of thyroidectomy specimens for PTEN can aid in the identification of patients with cowden syndrome. *Am J Surg Pathol* 2011;35(10):1505-1511.
- 11-Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 1997;275: 1943-1947.

- 12-Dahia PLM, Marsh DL, Zheng Z, Zedenius J, Komminoth P, Frisk T, Wallin G, Parsons R, Longy M, Larsson C, Eng C. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, *PTEN*, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res* 1997;57:4710-4713.
- 13-Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees J, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H, Eng C. Differential nuclear and cytoplasmic expression of *PTEN* in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 2000;156(5):1693-1670.
- 14-Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 2006;20(7):697-706.
- 15-Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. *PTEN*, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 2007;28(7):1379-1386.
- 16-Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the *PTEN* tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004;22(14):2954-2963.
- 17-Tallini G. Molecular pathobiology of thyroid neoplasms. *Endocrin Pathol* 2002;13(4):271-288.
- 18-Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, *PTEN/MMAC1*, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J Biol Chem* 1998;273(22):13375-13378.
- 19-Bruni P, Boccia A, Baldassare G, Trapasso F, Santoro M, Chiappetta G, Fusco A, Vigiato G. *PTEN* expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that *PTEN*-growth suppressing activity in thyroid cancer cells is mediated by p27^{kip1}. *Oncogene* 2000;19:3146-3155.
- 20-Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet* 2000;37:828-830.
- 21-Hall JE, Adbollahian DJ, Sinard RJ. Thyroid disease associated with Cowden syndrome: a meta-analysis. *Head and Neck* 2012; published online in Wiley Online Library in march 2012 (wileyonlinelibrary.com).DOI 10.1002/hed22971.
- 22-Pilarski R, Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up (again)? Expanding mutational and clinical spectra of the *PTEN* hamartoma tumor syndrome. *J Med Genet* 2004;41:323-326.
- 23-Nagy R, Ganapathi S, Comeras I, Peterson C, Orloff M, Porter K, Eng C, Ringel MD, Kloos RT. Frequency of germline *PTEN* mutations in differentiated Thyroid cancer. *Thyroid* 2011;21(5):505-510.

- 24-Zhou XP, Hampel H, Thiele H, Gorlin RJ, Hennekam RCM, Parisi M, Winter RM, Eng C. association of germline mutation in the *PTEN* tumor suppressor gene and Proteus and Proteus-like syndromes. *The Lancet* 2001;358:210-211.
- 25-Bondeson L, Ljungberg O. Occult papillary thyroid carcinoma in young and aged. *Cancer* 1984;53:1790-1792.
- 26-Delellis RA. Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* 2006;94:662-669.
- 27-Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condorius S, Wang Y, Trink A, El-Naggar A, Tallini G, Vasko V, Xing M. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1161-1170.
- 28-Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(12):1351-1361.
- 29-Wang Y, Hou P, Wang W, Ji M, Zhao S, Yan S, Sun X, Liu D, Shi B, Zhu G, Condouris S, Xing M. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(6):2387-2390.
- 30-Sozopoulos E, Litsiou H, Voutsinas G, Metsiades N, Anagnostakis N, Tseva T, Patsouris E, Tseleni-Balafouta S. Mutational and immunohistochemical study of the PI3K/Akt pathway in papillary thyroid carcinoma in Greece. *Endocrin Pathol* 2010;21:90-100.
- 31-Abubaker J, Jehan Z, Bavi P, Sultana M, Al-Harbi S, Ibrahim M, Al-Nuaim A, Ahmed M, Amin T, Al-Fehaily M, Al-Sanea O, Al-Dayel F, Uddin S, Al-Kuraya KS. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PI3CA alterations in a middle eastern population. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(2):611-618.
- 32-Catalano MG, Fortunati N, Boccuzzi G. Epigenetic modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. *Front Endocrinol* 2012;3(40):1-8.
- 33-Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying cancer. *Thyroid* 2009;19(12):1333-1342.
- 34-Xing M. Minireview: gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007;148:948-953.
- 35-Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107-116.

- 36-Hou P, Ji Meiju, Xing M. Association of *PTEN* gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-Kinase AKT signaling pathway in thyroid tumors. *Cancer* 2008;113(9):2440-2447.
- 37-Eszlinger M, Krohn K, Hauptmann S, Dralle H, Giordano TJ, Paschke R. Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(9):3286-3294.
- 38-Sangale Z, Prass C, Carlson A, Tikishvili E, DeGrado J, Lanchbury J, Stone S. A robust immunohistochemical assay for detecting *PTEN* expression in human tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19(2):173-183.
- 39-Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloss RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazafferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. The American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce. *Thyroid* 2009;19(11):1167-1214.
- 40-Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JWA, Wiersinga W, the European Thyroid Cancer Taskforce. European Consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006;154:787-803.
- 41-Dias EP, Pimenta FJ, Sarquis MS, Dias Filho MA, Aldaz CM, Fuji JB, Gomez RS, De Marco L. Association between decreased *WWOX* protein expression and thyroid cancer development. *Thyroid* 2007;17(11):1055-1059.
- 42-Pavelic K, Dedivitis RA, Kapitanovic S, Cacev T, Guirado CR, Danic D, Radosevic S, Brkic K, Pegan B, Krizanac S, Kusic Z, Spaventi S, Bura M. Molecular genetic alterations of *FHIT* and *p53* genes in benign and malignant thyroid gland lesions. *Mutat Res* 2006;599:45-57.
- 43-Cantara S, Pisu M, Frau DV, Caria P, Dettori T, Capezzone M, Capuano S, Vanni R, Pacini F. Telomere abnormalities and chromosome fragility in patients affected by familial papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(7):E1327-E1331.
- 44-Alvarez-Nunes F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, Leiva A, Matias-Guiu X, and the Thyroid Neoplasia Study Group. *PTEN* promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* 2006;16(1):17-23.
- 45-Kameyama K, Takami H, Miyajima K, Mimura T, Hosoda Y, Ito K, Ito K. Papillary carcinoma occurring within an adenomatous goiter of the thyroid gland in Cowden's disease. *Endocr Pathol* 2001;12(1):73-76.

- 46-Harach HR, Soubeyran I, Brown A, Bonneau D, Longy M. Thyroid pathologic findings in patient with Cowden disease. *Ann Diagn Pathol* 1999;3(6): 331-340.
- 47-Zambrano E, Holm I, Glickman J, Huang S, Perez-Atayde A, Kozakewich HPW, Schamberger RC, Nose V. Abnormal distribution and hyperplasia of thyroid C-cells in *PTEN*-associated tumor syndromes. *Endocr Pathol*2004;15(1):55-64.
- 48-Nigeow J, Mester J, Rybicki LA, Ni Y, Milas M, Eng C. Incidence and clinical characteristics of thyroid cancer in prospective series of individuals with Cowden and Cowden-like syndrome characterized by germline *PTEN*, *SDH* or *KLLN* alterations. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(12):E2063-E2071.
- 49-Smith JR, Marqusee E, Webb S, Nose V, Fishman SJ, Shamberger RC, Frates MC, Huang SA. Thyroid nodules and cancer in children with *PTEN* hamartoma tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(1):34-37.
- 50-Huang SC, Lee JK, Smith EJ, Coctolero RT, Tajima A, Beck SE, Weidner N, Carethers JM. Evidence for an hMSH3 defect in familial hamartomatous polyps *Cancer* 2011;117:492-500.
- 51-Schweppe RE, Haugen BR. Thyroid target KRAS^{GD12}/*PTEN*^{-/-} mice and their cell lines: new tools to study thyroid cancer biology. *Thyroid* 2011;21(9):941-944.
- 52-Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RMB, Maciel LMZ, Rosário PW, Vaismam M. Nódulos de tireoide e câncer diferenciado de tireoide: consenso brasileiro. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51(5):867-893.
- 53-Santarpia L, Myers JN, Sherman SI, Trimarchi F, Clayman GL, El-Naggar AK. Genetic alterations in the Ras/Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathways in the follicular variant follicular Papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 2010;116:2974-2983.
- 54-Stephen JK, Chitale D, Narra V, Chen KM, Sawhney R, Worsham MJ. DNA methylation in thyroid tumorigenesis. *Cancers* 2011;3:1732-1743.
- 55-Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J, Frost P, Dreisbach V, Blenis J, Gaciong Z, Fisher P, Sawyers C, Hendrick-Ellenson L, Parsons R. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in *Pten*^{+/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(18):10320-10325.
- 56-Dima M, Miller KA, Antico-Arciuch VG, Di Cristofano A. Establishment and characterization of cell lines from a novel mouse model of poorly differentiated thyroid carcinoma: powerful tools for basic and preclinical research. *Thyroid* 2011;21(9):1001-1007.

- 57-Jin N, Jiang T, Rosen M, Nelkin BD, Ball DW. Dual inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase and mammalian target of rapamycin in differentiated and anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(10):4107-4112.
- 58-Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(7):2449-2457.

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



PROJETO: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *PTEN* EM CARCINOMA PAPILAR DE TIREOIDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As causas de tumores da tireoide ainda são desconhecidas. A análise genética desses tumores ajuda detectar a origem dos mesmos, para criar novos tratamentos.

Alguns tumores da tireoide, mesmo de pequeno tamanho (< 1 cm), são muito malignos, com metástases em linfonodos ou em órgãos distantes, como pulmões e ossos.

Esta pesquisa propõe a análise de genes em tumores da tireoide, com ou sem metástases em linfonodos ou à distância, na tentativa de identificar se algum desses genes contribuem para o surgimento de tumores mais agressivos.

Gostaria de convidá-lo para participar dessa pesquisa.

Para isso, é necessário unicamente que você permita que façamos análises genéticas no tumor da tireoide que você já operou, que se encontra armazenado no setor de anatomia-patológica da Associação Mário Penna. Não há necessidade de novas cirurgias, biópsias ou outros tratamentos. Não há nenhum risco.

Este estudo poderá contribuir para a detecção de genes envolvidos nos tumores mais agressivos e, futuramente, para o surgimento de medicações para bloquear tais genes.

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidenciais. No entanto, os pesquisadores e, algumas vezes, o Comitê de Ética em Pesquisa, poderão ter acesso aos dados.

Os resultados da pesquisa serão publicados em revistas científicas e/ou apresentados em encontros científicos, sendo que, em qualquer publicação, seu nome não será revelado.

Sua participação é voluntária e se desejar, pode desligar-se dele a qualquer momento, sem penalidade ou prejuízo. Não haverá nenhum custo ou quaisquer compensação financeira.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta meu celular para esclarecimentos sobre o projeto, a qualquer momento.

Juliana Rocha Costa

Pesquisadora

(31) 8899-7578

Maria Marta Saques Soares

Orientadora

(31) 92822405

Comitê de Ética em Pesquisa da Associação Mário Penna: (31) 3299-9980

Declaro ter lido e compreendido este TERMO DE CONSENTIMENTO e concordo voluntariamente em participar deste estudo, sendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou do meu atendimento neste serviço, estando ciente dos propósitos do estudo, dos procedimentos a serem realizados, das garantias de confidencialidade e de acesso ao tratamento, além de garantia de esclarecimentos permanentes.

Paciente

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

ANEXO 2: DADOS DOS PACIENTES COM CARCINOMA PAPILAR DO HOSPITAL MÁRIO PENNA (PARTE 1)

PACIENTE	ANATOMO	SEXO	H FAM	RTX	IDADE DIAGNÓSTICO	ULTRA-SOM	PAAF	BMN	CIRURGIA	ESVAZIAMENTO	HISTOLOGIA
1	2937=08	FEM	0	SIM	31	BMN	COLOIDE	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
2	8985=10	MASC	0	0	38	NOD GRAU IV 0,8 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
3	6147=11	FEM	0	0	57	NOD GRAU III 0,9 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
4	2069=09	FEM	0	0	38	NOD GRAU IV 3,9 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
5	4477=09	MASC	0	0	59	NOD GRAU III 1 CM	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
6	7805=10	FEM	0	0	56	NOD GRAU IV 1,7 LE E 0,8 LD	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
7	12105=11	FEM	0	0	56	GRAU III LE 0,5 CM + HASHI	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
8	7682=10	MASC	0	0	52	NOD GRAU III 0,7	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
9	068=08	FEM	0	0	81	NOD GRAU III LD E LE 1,5 CM	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
10	6003=10	FEM	0	0	60	NOD GRAU III 2,6 LD	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
11	3371=12	FEM	0	0	45	NOD GRAU III LD 1,1	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
12	2377=11	FEM	0	0	58	NOD GRAU III 0,3	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
13	6743=10	FEM	0	0	74	NOD GRAU X	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
14	1881=08	MASC	0	0	48	NÃO TEM	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
15	8262=10	FEM	0	0	42	3 NOD GRAU II O > 1,8	COLOIDE	SIM	TOTAL	NÃO	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
16	2886=10	FEM	0	0	28	NOD GRAU IV 1,2 LD	NEO FOLICUL	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
17	3166=10	FEM	0	0	49	NOD GRAU II 3,2 E 0,6	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
18	11606=11	FEM	0	0	50	NOD GRAU IV 0,95 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
19	10030=10	FEM	0	0	38	NOD GRAU IV 1,7 LD	PAPILAR	NÃO	TOTAL	NÃO	PAPILAR CLASSICO
20	0943=10	FEM	0	0	33	NOD GRAU IV 2,2 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
21	0207=09	FEM	0	0	75	NOD GRAU III 1,9 LD	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
22	5001=08	FEM	0	0	53	NOD GRAU II 3,4 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
23	3330=09	FEM	0	0	70	NOD GRAU III 3,4 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
24	218=11	FEM	0	0	67	BMN NOD GRAU II	COLOIDE	SIM	TOTAL	NÃO	PAPILAR CLASSICO
25	1421=09	FEM	0	0	44	BMN	NÃO	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
26	1583=10	FEM	0	0	42	NOD GRAU II LE	NÃO	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
27	3591=10	FEM	SIM	0	45	NOD GRAU IV 0,6 LD	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
28	10512=11	FEM	0	0	48	NÃO	NÃO	NÃO	2 TEMPOS	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
29	3224=10	FEM	SIM	0	37	NOD GRAU IV 1,2 LD	COLOIDE	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
30	621=08	FEM	0	0	33	SEM NODULOS	NÃO	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
31	6984=10	MASC	0	0	34	NOD GRAU IV 1	INSATIS	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
32	1231=09	FEM	0	0	22	NODULOS	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
33	8089=10	FEM	0	0	45	NOD GRAU III ISTMO	NEO FOLICUL	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
34	2450=09	MASC	0	0	25	NOD GRAU III 3,2 LD	COLOIDE	NÃO	2 TEMPOS	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
35	8131=09	FEM	0	0	34	NODLD 2 CM	NEO FOLICUL	NÃO	2 TEMPOS	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
36	0199=09	FEM	0	0	35	NOD GRAU IV 1,5	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
37	10249=10	FEM	0	0	29	NOD GRAU III 4 LD	NEO FOLICUL	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
38	3266=11	FEM	0	0	61	BMN	PAPILAR LE E ISTMO	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
39	1242=10	FEM	0	0	54	NOD GRAU II 2,6 LD	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
40	5153=08	MASC	0	0	35	NOD GRAU IV 1,3 LD	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
41	437=08	FEM	0	0	58	BMN	NEO FOLICULAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
42	5307=10	FEM	0	0	59	NOD GRAU IV 2,6 E 1 LD	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
43	13298=11	FEM	0	0	59	NOD GRAU IV 4,9 LD	NEO FOLICUL	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR
44	2958=10	FEM	0	0	56	NOD GRAU IV 1,1 LD	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
45	12012=11	FEM	0	0	32	NOD GRAU IV 4 LE	PAPILAR	SIM	TOTAL	SIM	PAPILAR CLASSICO
46	0266=09	FEM	0	0	28	NOD GRAU II 0,9 LE	PAPILAR	NÃO	TOTAL	SIM	PAPILAR VARIANTE FOLICULAR

ANEXO 2: DADOS DOS PACIENTES COM CARCINOMA PAPILAR DO HOSPITAL MÁRIO PENNA (PARTE 2)

PO E AGRESSAO	TUMOR	TIREOIDE	MULTI	T	N	M	TNM	ESTADIO	RISCOS	RADIOIODO	PCI INICIAL	PCI FINAL	TGNS INICIAL	ANTITG	TGS ATUAL	ANTITG.	US ATUAL	ESTAD O
MICRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	1A	1A	0	T1A N1A M0	I	BAIXO	150	POS	NEG	1,28	POS	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO AGRESSIVO	++	+++	SIM	1A	1A	0	T1A N1A M0	I	BAIXO	350	POS	POS	63,64	NEG	1,91	NEG	NEG	ATIVO
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	NÃO	POS	NÃO	0,1	POS	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	2	0	0	T2 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NÃO	4,3	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	3	0	0	T3 N0 M0	III	ALTO	150	POS	NEG	0,19	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO AGRESSIVO	++	+++	SIM	3	0	0	T3 N0 M0	III	ALTO	150	POS	NEG	2,45	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	NÃO FEZ	NÃO	NÃO	0,1	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+++	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	NÃO FEZ	NÃO	NÃO	0,5	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	100	POS	NEG	1,07	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	++	+++	SIM	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	150	POS	NEG	0,2	POS	0,1	POS	NEG	LIVRE
MICRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	3	0	0	T3 N0 M0	III	ALTO	AGUARDA	AGUARDA	NÃO	0,1	NEG	X	X	NEG	ATIVO
MICRO AGRESSIVO	++	+++	NÃO	3	1A	0	T3 N1A M0	III	ALTO	150	POS	NEG	1,82	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	NÃO FEZ	NÃO	NÃO	3,86 SUP	NEG	0,72	NEG	NEG	LIVRE
MACRO AGRESSIVO	++	+++	NÃO	4A	1A	0	T4A N1A M0	IVA	ALTO	200	POS	NEG	0,62	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	NÃO FEZ	NÃO	NÃO	0,23	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	NEG	NÃO	0,1	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	+	+++	SIM	2	0	0	T2 N0 M0	II	BAIXO	100	POS	NEG	1,94	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	NEG	NÃO	0,1	POS	0,1	POS	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	NÃO FEZ	NÃO	NÃO	0,48	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO AGRESSIVO	++	+++	NÃO	3	1B	0	T3 N1B M0	I	BAIXO	150	POS	NEG	3,98	NEG	0,66	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	100	POS	NÃO	1	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NEG	0,1	POS	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	+++	+++	SIM	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NÃO	1,42	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	++	+++	SIM	1A	0	0	T1A N0 M0	I	M BAIXO	100	POS	NÃO	1,62	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO AGRESSIVO	++	+++	NÃO	1A	1A	0	T1A N1A M0	I	BAIXO	AGUARDA	NÃO	NÃO	7,5	NEG	6	NEG	POS	ATIVO
MACRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	4A	1A	0	T4A N1A M0	I	BAIXO	300	POS	POS	37	NEG	12	NEG	NEG	ATIVO
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	100	POS	NÃO	0,54	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	AGUARDA	AGUARDA	AGUARDA	AGUAR DA	AGUARDA	AGUAR DA0	AGUARDA	AGUARDA	ATIVO
MICRO AGRESSIVO	+	+++	SIM	3	1A	0	T3 N1A M0	I	BAIXO	150	POS	NEG	0,1	POS	0,1	POS	NEG	LIVRE
MICRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	3	1A	0	T3 N1A M0	I	BAIXO	450	NEG	NEG	90,6	NEG	20	NEG	NEG	ATIVO
MICRO AGRESSIVO	+	+++	SIM	1A	1A	0	T1A N1A M0	I	BAIXO	150	POS	AGUARDA	44,5	NEG	2,61	NEG	POS	ATIVO
MICRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	3	1A	0	T3 N1A M0	I	BAIXO	150	POS	POS	25,85	NEG	18	NEG	NEG	ATIVO
MICRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	3	0	0	T3 N0 M0	III	ALTO	100	POS	NEG	1,09	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	100	POS	NEG	0,27	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	+	+++	SIM	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NÃO	0,59	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	3	1A	0	T3 N1A M0	I	BAIXO	300	POS	NEG	23	NEG	0,16	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	2	0	0	T2 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NÃO	1,03	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NÃO	0,1	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	4A	1A	0	T4A N1A M0	IVA	ALTO	150	POS	NEG	2	NEG	2,42	NEG	POS	ATIVO
MACRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NEG	0,77	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+	+++	NÃO	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	100	NEG	NÃO	0,1	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MACRO INDOLENTE	++	+++	SIM	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NÃO	2,4	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE
MICRO INDOLENTE	+	+++	SIM	1A	0	0	T1A N0 M0	I	MUITO BAIXO	AGUARDA	AGUARDA	AGUARDA	AGUAR DA	AGUARDA	AGUAR DA	AGUARDA	AGUARDA	ATIVO
MACRO INDOLENTE	++	+++	NÃO	1	0	0	T1 N0 M0	I	BAIXO	100	POS	NÃO	AGUAR DA	AGUARDA	AGUAR DA	AGUARDA	AGUARDA	ATIVO
MACRO AGRESSIVO	+	+++	SIM	4A	1A	0	T4A N1A M0	II	BAIXO	200	POS	AINDA NÃO	74	POS	1	POS	NEG	ATIVO
MICRO AGRESSIVO	+	+++	NÃO	3	0	0	T3 N0 M0	I	BAIXO	100	NEG	NÃO	0,1	NEG	0,1	NEG	NEG	LIVRE

ANEXO 3: MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Teste de Mann-Whitney

É o teste alternativo ao Teste t de Student para testar a média de duas amostras independentes. Enquanto o teste t compara a média de duas amostras independentes, o teste de Mann-Whitney compara o centro de localização das duas amostras, como forma de detectar diferenças entre as duas populações correspondentes. Este teste é de utilização preferível ao t quando há violação da normalidade ou quando as variáveis de nível ordinal com duas ou três categorias. A perda de eficiência do teste de Mann-Whitney quando comparado ao teste t, é pequena.

Como o marcador PTEN é uma variável categórica ordinal, neste trabalho, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para testar a diferença entre os valores do marcador PTEN.

AS hipóteses testadas são:

H_0 : As duas populações são iguais em tendência central;

H_1 : As duas populações não são iguais em tendência central;

A hipótese nula (H_0) permite testar a homogeneidade das duas populações, ou seja, a igualdade de comportamentos dos dois grupos na população. E, ao invés de se basear em parâmetros da distribuição normal como a média e a variância, o teste de Mann-Whitney baseia-se na ordenação da variável.

A expressão do teste é dada por:

$$U = \text{mínimo}(U_1; U_2)$$

$$U_1 = n_1 x n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 x n_2 - U_1$$

Onde: n_1 : dimensão de menor amostra; n_2 : dimensão da maior amostra e R_1 : Soma das ordenações de menor amostra;

Kruskal Wallis

É a generalização do teste Mann-Whitney para mais de 2 grupos. Consiste numa alternativa não paramétrica ao teste Anova para um fator utilizado quando não se encontram reunidos os pressupostos da normalidade ou da igualdade das variâncias ou quando as variáveis são de nível ordinal com duas ou três categorias. Este teste é utilizado para testar a hipótese de igualdade em localização.

A partir de amostras aleatórias de k populações pretende-se testar a hipótese da existência de um parâmetro de localização comum a todas as populações contra a hipótese alternativa, de que, pelo menos uma das populações tende a apresentar valores superiores (inferiores) às outras.

As hipóteses a testar são:

H_0 : As k distribuições têm o mesmo parâmetro de localização

H_a : Pelo menos uma das k populações tem um parâmetro de localização superior ou inferior ao das outras.

O teste de Kruskal-Wallis baseia-se na soma das ordens dos grupos combinados por ordem crescente. A menor observação tem o valor 1, a seguinte o valor 2 e assim sucessivamente.

Caso existam observações com o mesmo valor (empates) atribui-se-lhes o valor médio dado pela posição sequencial das observações que lhe corresponderiam caso não houvessem empates.

Caso haja apenas 3 grupos com dimensão menor ou igual a 5, utilizam-se as tabelas de Kruskal-Wallis para se calcular o valor do teste. Em todas as outras situações faz-se a aproximação à distribuição do Qui-Quadrado com $(k-1)$ graus de liberdade.

O teste é dado por:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \times \sum_j^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3x(n+1), \text{ caso não haja empates,}$$

$$H_E = \frac{H}{1 - \frac{\sum_i^k (t_i^3 - t_i)}{n^3 - n}}, \text{ caso haja empates.}$$

Onde, n =dimensão da amostra, k =número de grupos, R_j = ordenação da categoria j ;

t_i =número de observações empatadas em cada categoria i .