



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de Fevereiro de 1808



Monografia

# **EXPRESSÃO DO FOXP3 NO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE (PTC)**

*Um novo marcador no auxílio do diagnóstico do PTC*

Thaizza Cavalcante Correia

Salvador - Bahia

Setembro, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA  
UNIVERSITÁRIA DE SAÚDE, SIBI - UFBA.**

C824 Correia, Thaizza Cavalcante

Expressão do FOXP3 no carcinoma papilífero da tireoide (PTC):  
Um novo marcador no auxílio do diagnóstico do PTC / Thaizza  
Cavalcante Correia. – Salvador, 2012.

44 f.

Orientador: Prof. Dr. Murilo Pedreira Neves Junior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade  
Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia, 2012.

1. Medicina. 2. Tireoide. 3. Tumores. 4. Saúde. I. Correia,

Thaizza Cavalcante. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de Fevereiro de 1808



---

# **EXPRESSÃO DO FOXP3 NO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE (PTC)**

*UM NOVO MARCADOR NO AUXÍLIO DO DIAGNOSTICO DO PTC*

Orientanda: Thaizza Cavalcante Correia

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Murilo Pedreira Neves Junior

Monografia de conclusão do componente curricular MED-B60, do currículo médico da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da FMB-UFBA.

Salvador - Bahia

Setembro, 2012

Monografia: **Expressão do FoxP3 no Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC): Um novo marcador no auxílio do diagnóstico do PTC**

Orientanda: Thaizza Cavalcante Correia

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>o</sup> Murilo Pedreira Neves Junior

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Membros Titulares:**

- Maria da Gloria Bonfim Arruda, Professora da FMB-UFBA
- Margarida Célia Lima Costa Neves, Professora da FMB-UFBA

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia aprovada pela Comissão, e julgada apta à apresentação pública no III Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do registro final do conceito (apto), pela coordenação do Núcleo de Formação Científica. Chefia do Departamento de Medicina da FMB-UFBA.

Salvador - Bahia

Setembro, 2012

## Agradecimentos

*Agradeço a todos os que me ajudaram na elaboração deste trabalho. Inicialmente a Drº Murilo Neves, que me concedeu a oportunidade de desenvolver em sua companhia esse projeto, me orientando e ajudando nas dificuldades encontradas, tanto na pesquisa quanto no curso. A Milena Brachmans, companheira nessa pesquisa, que muito me ajudou na construção de todo o trabalho. Aos amigos do curso que estiveram ao meu lado nessa trajetória. A minha mãe, Odete Passos, que mesmo distante está sempre presente e a Rogério Pinheiro companheiro de todos os momentos.*

*“Eu tenho uma espécie de dever, de dever de sonhar, de sonhar sempre, pois sendo mais do que um espectador de mim mesmo, eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso...”.*

**Fernando Pessoa**

## Resumo

CORREIA, TC. **Expressão do FoxP3 no Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC)**. Salvador; 2012. Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

**Introdução:** Tumores da tireóide são endócrinopatias comuns na população entre 20 e 60 anos onde cerca de 40% apresentam nódulos tireoideanos, e apenas 5% a 10% desses são malignos, a maior parte composta dos carcinomas papilíferos da Tireoide (PTC), sendo hoje o tipo mais comum de neoplasia endócrina maligna e responsável por mais de 70% de todos os cânceres da tireóide. O FOXP3 é um membro da família de reguladores da transcrição, a qual está envolvida na regulação do desenvolvimento e função do sistema imune. Ele é expresso em células normais e cancerosas não-linfocíticas. O FOXP3 é expresso em vários tecidos tumorais não só epiteliais, como pulmão, mama, cólon, mas também em tecidos originais, como melanoma e leucemias. Desta forma, este estudo tem o objetivo de identificar a presença desta proteína no Carcinoma Papilífero da Tireóide.

**Metodologia:** De 50 casos de PTC foram selecionados 30 a partir de uma tabela de randomização, sendo feita Imunoistoquímica com anticorpo FOXP3. Excluído 1 caso por falta de dados. **Resultados:** Dos vinte e nove (100%) pacientes diagnosticados com PTC, vinte e três (79.3%) do sexo feminino e seis (20.7%) do sexo masculino, a média de idade de quarenta e dois anos. Dezoito (62.1%) foram diagnosticados apenas com PTC e 11 (37.9%) tinham tireoidite de Hashimoto (HT) concomitantemente. No processo de Imunoistoquímica foi observado que oito (27.6%) pacientes apresentaram resultado de FOXP3 negativo enquanto que vinte e um (72.4%) pacientes apresentaram resultado de FOXP3 positivo. Nas regiões da glândula onde havia apenas HT e em zonas de glândula sem alteração (controle interno) não houve positividade para FoxP3, sugerindo especificidade desse reagente em relação a marcação isolada do PTC. **Conclusão:** É necessário ressaltar a importância da continuidade do estudo para a reprodução e confirmação dos dados de positividade do foxp3, como identificador de PTC.

**Palavras Chave:** Neoplasias da Glândula Tireóide, Carcinoma Papilífero da Tireóide, Marcadores Tumorais, Imuno-histoquímica, FoxP3.

# SUMÁRIO

<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>03</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>03</b>
<b>Índice de Gráficos.....</b>	<b>03</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>04</b>
1.1 Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC).....	07
1.1.1 Aspectos Gerais.....	07
1.1.2 Aspectos Clínicos.....	09
1.1.3 Aspectos Diagnósticos.....	10
I. Punção Aspirativa por Agulha Fina – PAAF.....	11
II. Histopatologia.....	12
III. Imunohistoquímica.....	15
A. Tireoglobulina.....	16
B. HBME-1.....	16
C. Citoqueratina 19 - Ck19.....	16
D. Galectina-3.....	17
E. Factor Transcrição da Tiróide -1 (TTF-1).....	18
IV. Marcadores Moleculares.....	18
A. Rearranjo de RET/PTC.....	18
B. Mutações BRAF.....	19
C. Mutações em P63.....	20
1.2 Forkhead Box Protein 3 (FoxP3).....	21
<b>2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>24</b>
2.1 Seleção de Biópsias.....	24
2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	24
2.3 Processamento e análise do Material.....	24
<b>3. Resultados.....</b>	<b>26</b>
3.1 Imunoistoquímica de FoxP3 no PTC.....	29
3.2 Imunoistoquímica de FoxP3 na TH.....	30
3.3 Gráficos de Expressão de Foxp3 No PTC.....	31
<b>4. Discussão.....</b>	<b>32</b>
4.1 Foxp3 como marcador de PTC.....	33

4.2	Diferença na Expressão de FoxP3 - PTC x TH.....	34
4.3	Diferenciação de Nódulos Epiteliais Atípicos de TH e PTC.....	34
4.4	Mecanismos de Carcinogênese do Foxp3.....	35
4.5	Possibilidade de Novas Técnicas Diagnósticas para PTC.....	36
<b>5.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>Anexo.....</b>	<b>44</b>
7.1	Cópia do Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Espécime cirúrgico de nódulo sólido de Carcinoma Papilífero da Tireóide.

**Figura 2.** Variantes Histológicas do Carcinoma Papilífero de Tireóide

**Figura 3.** Características Citológicas específicas de Carcinoma Papilífero de Tireóide

**Figura 4.** Marcação Imunohistoquímica do Carcinoma Papilífero de Tireóide para HBME-1 e CK 19

**Figura 5.** Coloração FoxP3 em Imunohistoquímica de células tumorais

**Figura 6.** Imunohistoquímica com marcador de FoxP3 em carcinoma Papilífero de Tireóide

**Figura 7.** Imunohistoquímica com marcador de FoxP3 em Tireoidite de Hashimoto

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Resultados Gerais do Estudo

**Tabela 2.** Especificação da Expressão de FoxP3 no Carcinoma Papilífero da Tireóide

**Tabela 3.** Estratificação das características dos subgrupos de Carcinoma Papilífero da Tireóide com e sem associação com Tireoidite de Hashimoto

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Expressão Global de FoxP3 no Carcinoma Papilífero da Tireóide

**Gráfico 2.** Estratificação da Expressão de FoxP3 no Carcinoma Papilífero da Tireóide

# 1. Introdução

Tumores da tireóide são endócrinopatias comuns na população entre 20 e 60 anos onde cerca de 40% apresentam nódulos tireoideanos, sendo a maioria nódulos benignos (Saleh *et al.* 2010). Apenas cerca de 5% a 10% dos nódulos da tireóide são malignos, a maior parte se faz dos carcinomas papilíferos da Tireoide (PTC) (Vierlinger *et al.* 2011). A incidência de câncer de tireóide dobrou nos últimos 30 anos, provavelmente por causa do aumento da detecção de nódulos ainda pequenos e de baixo risco (Vriens *et al.* 2011). Com melhores técnicas de diagnóstico o carcinoma papilífero de tireóide (PTC) passou a ser identificado com muito mais frequência do que no passado (Eze *et al.* 2011), sendo hoje o tipo mais comum de neoplasia endócrina maligna e responsável por mais de 70% de todos os cânceres da tireóide (Khanafshar *et al.* 2011). A incidência da PTC no mundo tem aumentado ao longo dos últimos 15 a 20 anos, especialmente nos países desenvolvidos (Khanafshar *et al.* 2011). A etiologia da PTC está relacionada com meio ambiente, genética e fatores hormonais. (Lloyd *et al.* 2011).

A associação entre Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC) e Tireoidite de Hashimoto (HT) é fortemente questionada na comunidade científica porque eles compartilham várias características morfológica, imunohistoquímica e molecular (Benvenga *et al.* 2005; Cipolla *et al.* 2005), estudos vem sendo realizados para demonstrar a associação entre essas duas doenças (Strauss *et al.* 1983), sugerindo uma relação não apenas acidental, mas a presença de um processo inflamatório crônico no qual a ativação de genes pode ser um fator de transformação maligna (Cipolla *et al.* 2005; Cotran *et al.* 2005.).

O rearranjo cromossômico RET/PTC (fusão do RET tirosina cinase-5 na região terminal de genes heterogêneos) é marcador útil para a ativação oncogênica de células foliculares da tireóide, também encontrado em tecidos de tireóide de pacientes com TH em 68% dos casos relatados pelo estudo de Rhoden *et al.* 2006. (Cotran *et al.* 2005; Nikiforov *et al.* 2006; Roberti *et al.* 2006; Rhoden *et al.* 2006). O RET/PTC leva à expressão de RP3 em tecidos da tireóide, fornecendo antígenos e simulando quimiotaxia na infiltração de tecidos por monócitos e linfócitos, evocando uma forte resposta imunológica (Nikiforov *et al.* 2006; Rhoden *et al.* 2006). Além disso, células da tireóide que expressam RP3

secretam um grande número de citocinas inflamatórias e induzem a transformação com contorno irregular das células nucleares, como o citoesqueleto (Strauss *et al.* 1983; Cotran *et al.* 2006; Rhoden *et al.* 2006; Fusco *et al.* 2007). Pacientes que foram expostos à radiação atômica, como observado em Chernobyl, desenvolveram não apenas RET/PTC com carcinoma papilar, mas também Tireoidite de Hashimoto (Unger *et al.* 2004).

Outro importante fator é a freqüente detecção de p63 na TH e câncer da tireóide em contraste com a detecção incomum de pacientes com outros cânceres e Doença de Graves. Isso leva a proposição de que essas duas doenças são iniciadas por células-tronco pluripotentes restantes p63 positivas (Cotran *et al.* 2006; Nikiforov *et al.* 2006; Unger *et al.* 2004).

O FOXP3 (*Foxhead Box Protein 3*) é um membro da família de reguladores da transcrição *forkhead/winged-helix*, a qual está envolvida na regulação do desenvolvimento do sistema imune (Ladoire *et al.* 2010), bem como na sua função (Merlo *et al.* 2009; Fontenot *et al.* 2003). É codificado por um gene regulatório que exerce papel central no desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) (Hori *et al.* 2003).

Normalmente o FOXP3 é encontrado em células Treg, no qual exerce sua função no desenvolvimento e controle da multiplicação celular (Ghebeh *et al.* 2008). A baixa expressão de FOXP3 em células Treg CD4 e CD25 tem predisposto a doenças autoimunes como a Tireoidite de Hashimoto (Zhou *et al.* 2009). FOXP3 é expresso em células normais e cancerosas não-linfocíticas (Ladoire *et al.* 2010, Martin *et al.* 2010), sugerindo que este marcador possa ter um significado mais amplo na carcinogênese do que se pensava inicialmente (Martin *et al.* 2010). Uma elevada densidade de células Treg FOXP3<sup>+</sup> infiltradas no tumor tem sido associada a um desfecho desfavorável em vários tumores sólidos, incluindo tumores de ovário, de pâncreas e o carcinoma hepatocelular (Salama *et al.* 2009). O FOXP3 é expresso em vários tecidos tumorais não só epiteliais, como pulmão, mama, cólon, mas também em tecidos originais, como melanoma e leucemias (Karaniakas *et al.* 2008). Não só como fator importante para inicialização do câncer, o FOXP3 também teria a função de perpetuar, transformando em um fator de prognóstico ruim (Ladoire *et al.* 2009).

O conhecimento do FOXP3 e a sua correlação com a recorrência, metástase e prognóstico sugere que o melhor estudo desta proteína pode guiar os oncologistas no tratamento dos cânceres, realizando terapia neoadjuvante, adjuvante, transformando assim o FOXP3 em biomarcador de alta malignidade (Schreiber 2007).

Ainda não foi demonstrado em estudos científicos se existe essa mesma correlação entre a expressão do FOXP3 e a proliferação de células tumorais no Carcinoma Papilífero da Tireóide isolado ou em associação com TH. Deste modo, este estudo tem o objetivo de identificar a presença desta proteína no Carcinoma Papilífero da Tireóide.

## 1.1 Carcinoma Papilífero da Tireoide (PTC)

### 1.1.1 Aspectos Gerais

Os tumores da tireoide representam mais de 90% de todos os cânceres endócrinos, sendo o Carcinoma Papilífero a sua forma mais comum e de melhor prognóstico (Santoro *et al.* 2004). São caracterizados por alterações genéticas diferentes, entre as quais envolvem rearranjos de RET e TRK, e mutações em BRAS, RAS e P53. A alteração da proteína RET é uma das mais importantes, pois pode ser encontrada no tecido da tireoide de pacientes com doença inflamatória crônica, como a tireoidite de Hashimoto (TH) (Neves Jr *et al.* 2009). Fatores ambientais, em especial a deficiência de iodo, têm importante papel na patogênese desse tumor. Outros fatores, como a radioterapia externa na infância e adolescência, exposição à radiação ionizante, doença tireoidiana preexistente e fatores genéticos, entre eles mutação de RAS, proteína ERK e rearranjos do RET/ PTC estão associados com o aumento do desenvolvimento do Carcinoma Papilífero (Camandaroba *et al.* 2009). O uso difundido da radiação-X na década de 1950 para o tratamento de condições como acne e hipertrofia do timo, contribuiu para a ampliação da incidência de PTC (Lloyd *et al.* 2011). Este avanço pode ser em parte, por melhores métodos de detecção, maior exposição ambiental, ou talvez, uso de radiação ionizante (Khanafshar *et al.* 2011). Um fato importante é que em pacientes que foram expostos à radiação atômica, como observado em Chernobyl, desenvolveram não apenas RET/PTC com carcinoma papilar, mas também Tireoidite de Hashimoto (Unger *et al.* 2004).

Pacientes com PTC geralmente se apresentam com um nódulo solitário palpável na tireoide e frio no pet-scan com iodo radioativo (Lloyd *et al.* 2011), podendo as vezes ser uma massa na forma de bócio multinodular. Ocasionalmente, pacientes com PTC apresentam-se com linfadenopatia cervical (Khanafshar *et al.* 2011). O envolvimento dos linfonodos de Delfos é um sinal de mal prognóstico em PTC, uma vez que pode indicar doença avançada com a necessidade de examinar os compartimentos linfáticos central e lateral com mais cuidado (Lloyd *et al.* 2011). Nódulos pequenos podem ser incidentalmente descoberto por estudos diagnósticos, que são realizados por outras indicações (Khanafshar *et al.* 2011), através de exame de ressonância magnética e

tomografia computadorizada e geralmente não tem significado clínico, especialmente em pacientes jovens (menos de 40 anos), já que tais indivíduos têm uma sobrevida de 20 anos de mais de 98% mesmo com tumores palpáveis (Lloyd *et al.* 2011). Os testes de função tireoidiana normalmente não são alterados pelo PTC (Khanafshar *et al.* 2011).

Embora o PTC possa ocorrer em qualquer faixa etária, ele se apresenta mais prevalente entre os 45 a 60 anos de idade e é mais comum em mulheres com uma predominância de dez a 20 casos femininos para um masculino (Camandaroba *et al.* 2009), e a agressividade do PTC aumenta significativamente nos pacientes mais velhos (Khanafshar *et al.* 2011). Apesar de ser uma doença de "mulheres maduras", é a principal causa de bócio e hipotireoidismo adquirido em crianças e adolescentes em áreas não endêmicas (Camandaroba *et al.* 2009). O prognóstico para a maioria dos pacientes com PTC é excelente (O'Neill *et al.* 2011), no entanto, apesar do bom prognóstico, PTCs pode dar origem a recorrências e/ou metástases, por vezes, muitos anos após o diagnóstico (Eloy *et al.* 2011). A recorrência loco-regional ocorre em 20-30% dos pacientes 10 a 20 anos após o diagnóstico inicial, e está associada com diminuição da sobrevida (O'Neill *et al.* 2011). Atuais sistemas de estadiamento não identificam com segurança todos os pacientes em risco de recorrência e mortalidade (O'Neill *et al.* 2011), fazendo necessária a pesquisa de oncogenes envolvidos na formação de PTC e biomarcadores para a doença e identificação de suas formas mais agressivas. Existem várias características clínicas e/ou morfológicas do PTC, que têm sido freqüentemente, embora nem sempre, associado a um prognóstico menos favorável, como idade avançada no momento do diagnóstico, sexo masculino, tamanho do tumor acima de 1 cm, extensão extra-tireoidiana, multicentricidade, ausência de encapsulamento total, invasão vascular e metástases distantes (Eloy *et al.* 2011).

Atualmente, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é o método mais comum de examinar nódulos tireoidianos solitários (Lloyd *et al.* 2011), e convencionalmente é através desta técnica que é feita uma discriminação entre nódulos tireoidianos benignos e malignos, seguido de avaliação citológica (Vierlinger *et al.* 2011). Ao contrário dos carcinomas de células foliculares e de células de Hórtle, o Carcinoma Papilífero da tireóide (PTC) tem características bem definidas ao exame citológico através da PAAF (Das *et al.* 2010), essas características específicas possibilitaram a sua subdivisão em 16

variantes na última classificação da OMS (Eloy *et al.* 2011), que possuem características citológicas e prognósticos distintos. Dentre essas variantes, os subtipos PTC clássico (CPTC) e a variante folicular do PTC (FVPTC) são as variantes mais frequentemente diagnosticadas (Eloy *et al.* 2011). O PTC convencional mostra uma arquitetura papilar com ramificação. As papilas são cobertas por células com citoplasma eosinofílico e os núcleos são aumentados (Lloyd *et al.* 2011). Os CPTC e FVPTC apresentam citoarquitetura, alterações moleculares e comportamento biológico distinto. E a maioria dos casos evolui favoravelmente, os pacientes têm uma sobrevida de 10 anos até 98%, tendo melhores resultados em pacientes com tumores encapsulados (Eloy *et al.* 2011).

A Citologia através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é amplamente utilizada como uma ferramenta importante para o diagnóstico de lesões da tireóide (Das *et al.* 2010). Apesar dos muitos avanços no diagnóstico e tratamento dos nódulos e cânceres de tireóide, estes métodos têm uma baixa especificidade bem conhecida, resultando em um diagnóstico de "indeterminado" ou "suspeitas" em 10% - 20% dos casos (Vierlinger *et al.* 2011). A citologia com PAAF é considerado a ferramenta mais valiosa para o diagnóstico pré-operatório de PTC. No entanto, durante a rotina de cito-diagnóstico, é evidenciado que um grande número de casos é diagnosticado como suspeitos de PTC (Das *et al.* 2010). Esses pacientes geralmente se submetem a cirurgia, embora em apenas 20% desses casos, os nódulos são realmente malignos. Isto leva a uma série de pacientes tratados desnecessariamente para a doença maligna (Vierlinger *et al.* 2011).

### **1.1.2 Aspectos Clínicos**

O Carcinoma Papilífero de tireóide (PTC) tem diversos aspectos clínicos e mais comumente se apresenta como um nódulo de tireóide que é descoberto por acaso ou em exame de rotina. Raramente, os pacientes se apresentam com metástases em linfonodos do pescoço ou com rouquidão causada pelo envolvimento do nervo laríngeo recorrente (Al-Brahim *et al.* 2006).

O PTC apresenta disseminação metastática por via linfática e sua evolução costuma ser lenta e insidiosa, quase sempre, pode ser totalmente curado pela tireoidectomia total (Sclafani *et al.* 1993), seguida ou não da ablação do parênquima tireoidiano residual através do iodo radioativo.

Metástases à distância como uma apresentação principal é um achado extremamente incomum (Al-Brahim *et al.* 2006; Chrisoulidou *et al.* 2011), mas alguns casos, no entanto, mostram evolução desfavorável, invadem os tecidos vizinhos e provocam metástases à distância, o que agrava o quadro do paciente, já que a abordagem desse tipo de quadro clínico não está bem definida, não havendo atualmente uma forma realmente eficaz para o tratamento desta situação (Chrisoulidou *et al.* 2011; Iyer *et al.* 2011).

O PTC é um carcinoma bem diferenciado e por sua vez, pode ser subclassificado de acordo com o aspecto histológico em diversas variantes (Rosai 2004). Essas variantes apresentam características clínicas distintas, correlacionada com o tipo de mutação apresentada pelo tumor e seu nível de diferenciação. Sendo assim essas características específicas serão abordadas na discussão histopatológica de cada variante.

### **1.1.3 Aspectos Diagnósticos**

A investigação de um nódulo tireoidiano geralmente inclui ultrassonografia, exame nuclear, e biópsia por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) (Al-Brahim *et al.* 2006; Das *et al.* 2010). Padrões ultrassonográficos são convencionalmente aplicados para distinguir nódulos tireoidianos benignos e malignos. Entre esses padrões, 2 são característicos do PTC. O primeiro é a presença de um nódulo sólido, hipoecóico com focos ecogênicos discretos, apoiada pela presença de microcalcificação, e o segundo padrão é o nódulo sólido, hipoecóico com focos ecogênicos grosseiros (Das *et al.* 2010). Na varredura nuclear por cintilografia, PTC é geralmente um nódulo frio (baixa captação do radioisótopo), e raramente pode se apresentar como um nódulo quente (alta captação de radioisótopo). É importante notar que a captação do tecnécio é mais comum do que a captação de iodo, e apenas o último prediz uma lesão hiperfuncionante associada com supressão de tireotropina e aumento da função da tireóide (Al-Brahim *et al.* 2006).

## **I. Punção Aspirativa por Agulha Fina – PAAF**

Exame citológico da punção aspirativa por agulha fina é o principal meio para distinguir nódulos benignos de malignos. No entanto, a citologia como inconclusiva é muito frequente, por isso, a introdução de marcadores moleculares para o diagnóstico pré-operatória de nódulos tem sido propostos nos últimos anos (Marotta *et al.* 2011).

PAAF de tireóide é atualmente, o único teste capaz confiavelmente de detectar o câncer de tireóide, e na maioria das vezes em pacientes com um ou mais nódulos da tireóide não existem critérios clínicos, ultra-sonográficos ou cintilográficos proporcionando a mesma precisão de diagnóstico que o estudo citopático produto de uma PAAF tireóide (Vielh *et al.* 2006). Há certas situações que exigem cautela na avaliação da morfologia nuclear por causa das mudanças morfológicas que se assemelham ao PTC, sugerindo uma neoplasia, quando pode se tratar de um processo inflamatório crônico (Al-Brahim *et al.* 2006).

Estudos mostram que a PAAF de tireóide tem uma alta sensibilidade, variando de 92 a 98% e valor preditivo negativo da ordem de 97%, mas apresenta uma baixa especificidade por causa dos resultados "suspeitos de malignidade", "duvidoso" ou "indeterminado" (Al-Brahim *et al.* 2006; Vielh *et al.* 2006).

Nódulos palpáveis da glândula tireóide são um problema de comum ocorrência clínica. A maioria das lesões são de natureza benigna. O diagnóstico diferencial entre nódulos benignos e malignos baseia-se na avaliação citológica das células da tireóide obtida por uma punção aspirativa, coradas por métodos de May-Grünwald Giemsa ou Papanicolaou (Marotta *et al.* 2011; Das *et al.* 2010). No entanto, um número relevante de nódulos da tireóide apresentam sinais morfológicos imprecisos de PTC e representam difíceis desafios de precisão diagnóstica. Por conta desses achados, muitos marcadores diagnóstico de malignidade têm sido investigados na tentativa de melhorar a precisão do exame citológico por PAAF (Marotta *et al.* 2011).

## II. Histopatologia

O PTC possui diferentes morfologias macroscópicas, podendo variar de menos de um centímetro para vários centímetros de diâmetro (Khanafshar *et al.* 2011), ser sólido ou cístico com excrescências papilares na variante clássica (Al-Brahim *et al.* 2006). Geralmente o tumor principal é sólido, sendo em alguns casos composto pela combinação entre sólido e cístico e raramente são observados tumores que se apresentam completamente císticos. Tumores metastáticos podem ser císticos, enquanto a lesão primária é completamente sólida (Khanafshar *et al.* 2011; Iyer *et al.* 2011). Os nódulos sólidos normalmente ter uma cor bronzeada e uma consistência firme e geralmente mostram uma superfície de corte branca e firme com bordas irregulares e ocasionais depósitos de calcificação (Khanafshar *et al.* 2011). (Figura 1) Os limites do nódulo podem ser infiltrativos ou bem circunscritos, com ou sem uma cápsula. É possível se evidenciar uma proeminente esclerose e alterações degenerativas focais podem ocorrer espontaneamente ou como resultado de PAAF anterior (Lloyd *et al.* 2011; Al-Brahim *et al.* 2006).

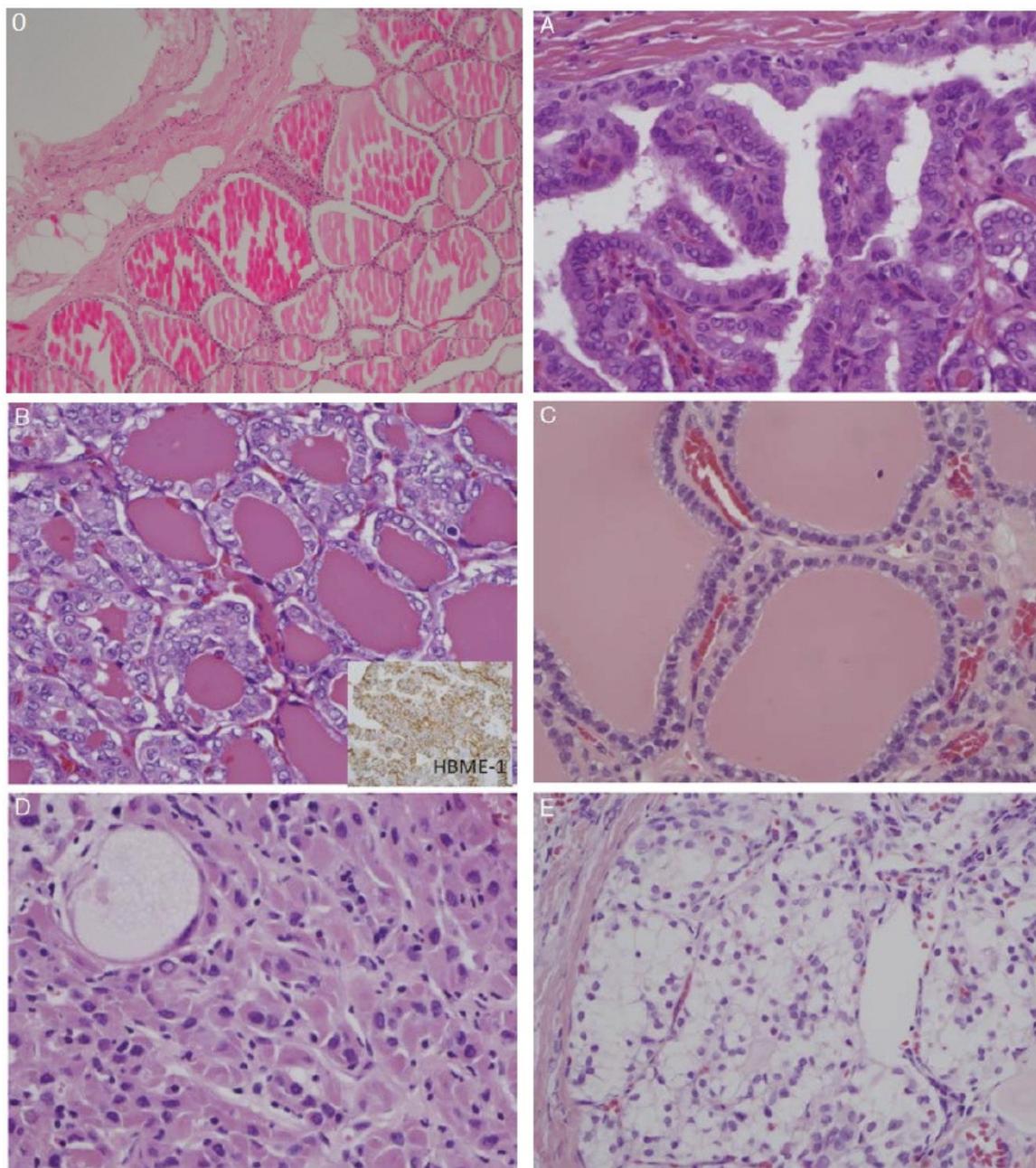


**Figura 1.** Espécime cirúrgico apresentando nódulo sólido, de aspecto homogêneo e coloração esbranquiçada, sem focos hemorrágicos ou necróticos, com margens mal delimitadas, não capsulado, com invasão extratireoidiana e de consistência firme. O diagnóstico foi de carcinoma Papilífero (PTC).

*Fonte: Predictive Value for Malignancy of the Thyroid Nodule Macroscopically, Dedivites et al. 2010*

Muitas variantes da PTC têm sido relatadas ao longo dos anos, sabe-se que a variante clássica é mais comumente encontrada nas biópsias, mas muitas subdivisões foram traçadas, visto que algumas dessas apresentam diferenças morfológicas e prognósticas.

Algumas das classificações para PTC além da clássica, foram demonstradas por Khanafshar *et al.* 2011 em sua revisão, sendo elas: Variante folicular; Microcarcinoma papilífero; Variante Macrofolicular; Variante Oxifílicas; Variante de Células Claras; Variante Warthin-Like; Variante Cribiforme Morular; Variante Sólido; Variante de Células Altas; Variante de Células Colunares; Variante esclerosante Difuso e Carcinoma Papilífero da Tireóide com Estroma Fasceíte Nodular – Like (Figura 2).



**Figura 2.** Algumas Variantes do carcinoma papilífero de tireóide. **0**, Glandula Tireóide Saudável, tecido tireoidiano com celularidade e arquitetura normais. **A**, PTC Variante clássica com arquitetura papilar e sobreposição típica, ranhuras, núcleos claros com inclusão ocasional. **B**, PTC Variante folicular, com

folículos irregulares, núcleos aumentados e folículos de revestimento pequenos (com positividade membranosa para HBME-1). **C**, PTC Variante macrofolicular é composta predominantemente por macrofoliculos. **D**, PTC Variante oxifílica com citoplasma profundamente eosinofílico. **E**, PTC Variante de células claras com citoplasma claro abundante / vacuolizado, lembrando carcinoma de células claras do rim.

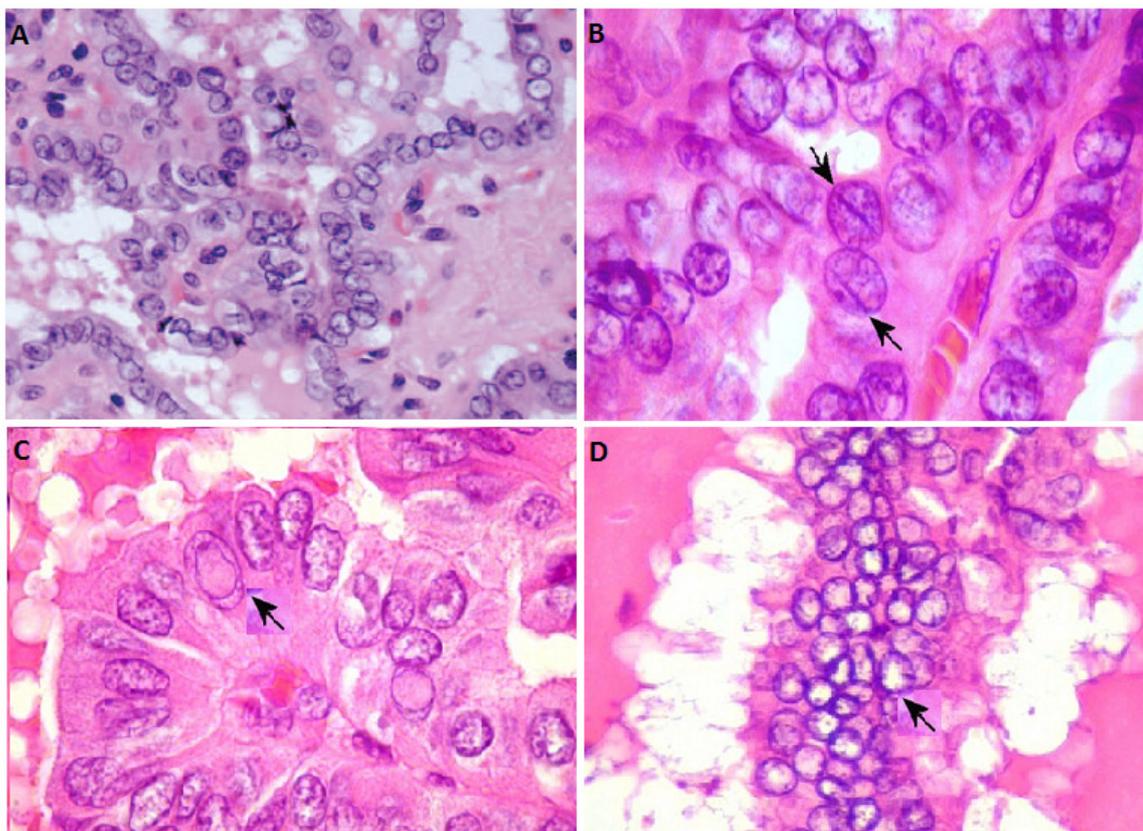
*Fonte: The Spectrum of Papillary Thyroid Carcinoma Variants. Khanafshar et al. 2011.*

Como indicado em estudos, variantes do PTC ou outros padrões histológicos podem se correlacionar com o prognóstico do paciente. (Lin *et al.* 2011). Algumas dessas variantes têm grande importância prognóstica e, portanto, importante fazer a diferenciação do PTC clássico. A OMS reconhece uma subcategoria de variantes biologicamente agressivas que inclui os tipos, variante esclerosante difuso, variante de células altas e variante de células colunares (Khanafshar *et al.* 2011; Lin *et al.* 2011). A exemplo de PTC agressivo, a variante sólido é caracterizada por ser um tumor não encapsulado, com invasão de margens e compreende aproximadamente 3% de PTCs. Nesta variante a morfologia nuclear é típico de carcinoma papilífero, estando associado com o comportamento agressivo e alta frequência de metástases à distância, em comparação com um grupo correspondente do variante clássico (Al-Brahim *et al.* 2006), apresentando uma incidência significativamente maior de doença extra-tireoidiana, recorrência e metástases, quando comparados com um grupo correspondente do variante usual de PTC em pacientes de semelhante idade, sexo e data de diagnóstico (Lin *et al.* 2011; Al-Brahim *et al.* 2006)

O diagnóstico de PTC baseia-se na morfologia nuclear do tumor e essas características precisam ser vistos em uma população significativa de células (Khanafshar *et al.* 2011; Lloyd *et al.* 2011). Abaixo estão listadas as alterações nucleares apresentadas pela célula tireoidiana, necessárias para o diagnóstico de PTC. (Figura 3)

1. Núcleos aumentados e alongados, com sobreposição e aglomeração;
2. Contorno nuclear irregular;
3. Cromatina de compensação com marginação periférica, dando origem aos núcleos dos olhos da órfã Annie;
4. Micronúcleolos múltiplas localizadas imediatamente abaixo a membrana nuclear;
5. Sulcos intranucleares resultantes da irregularidade nuclear (Grooves);

6. Pseudoinclusões citoplasmáticas intranucleares: acúmulo de citoplasma em proeminentes ranhuras nucleares (Al-Brahim *et al.* 2006).



**Figura 3:** Citologia específica de PTC. **A**, Morfologia nuclear que caracteriza carcinoma papilífero inclui núcleos alargados sobrepostos, que são claros por causa de a marginação periférica da cromatina, e contornos irregulares que formam sulcos e inclusões citoplasmáticas **B**, Sulcos intranucleares resultantes da irregularidade nuclear (Grooves). **C**, Pseudoinclusões citoplasmáticas intranucleares: acúmulo de citoplasma em proeminentes ranhuras nucleares. **D**, Cromatina de compensação com marginação periférica, dando origem aos núcleos dos olhos da órfã Annie.

*Fonte: Papillary Thyroid Carcinoma, An Overview. Al-Brahim et al. 2006.*

### III. Imunohistoquímica

Os PTCs por possuírem diversas características nucleares específicas são geralmente fáceis de diagnosticar com base nos critérios de morfologia nuclear dentro de um nódulo. No entanto, existem nódulos que têm características nucleares sutis, e na ausência de comportamento invasivo, tal como no caso de nódulos bem circunscritos com arquitetura folicular, a distinção entre benigno ou maligno é difícil no diagnóstico diferencial. Exames complementares podem ajudar a chegar a um diagnóstico preciso. Vários

marcadores imunohistoquímicos são de algum valor e sua aplicação na citologia para conclusão diagnóstica tem sido sugerida, mas existem limitações, como evidenciado pela falta de especificidade de vários marcadores discutidos (Al-Brahim *et al.* 2006).

### **A. Tireoglobulina**

A expressão de um anticorpo, dirigido contra a tiroglobulina é positivo em todas as lesões da tireóide. É moderadamente expresso no PTC e instável em carcinomas anaplásicos. Também é positivo em todas as lesões benignas. Por conseguinte, não é um marcador de malignidade, mas sim um marcador de origem da tireóide. Existe utilidade no caso de diagnóstico diferencial com metástase (Vielh *et al.* 2006).

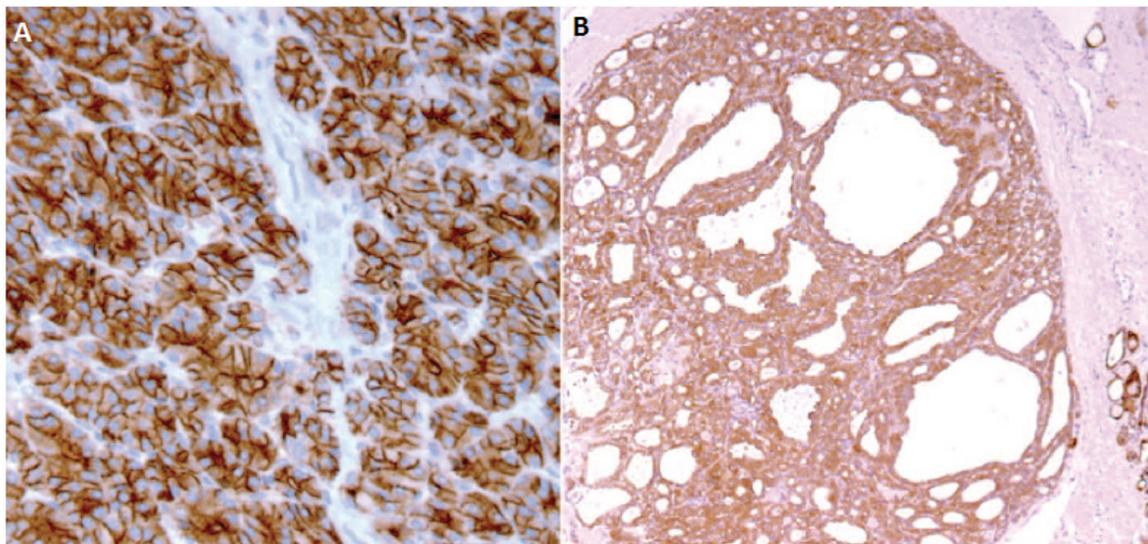
### **B. HBME-1**

HBME-1 é um anticorpo monoclonal, dirigido contra um epítipo desconhecido, que era inicialmente promovida como um marcador de células mesoteliais (Al-Brahim *et al.* 2006; Vielh *et al.* 2006). Na tireóide, HBME-1 é quase que exclusivamente expresso em neoplasias malignas, incluindo carcinoma papilífero, enquanto que as lesões benignas seu resultado é negativo (Saleh *et al.* 2010; Al-Brahim *et al.* 2006). HBME-1 é o marcador mais específico da malignidade tiroide (Al-Brahim *et al.* 2006). A maioria dos autores lhe confere uma sensibilidade, da ordem de 80%. No entanto, este anticorpo aparece também positivo em alguns adenomas e, em alguns nódulos benignos vesiculares dentro de tireóide multinodular (Figura 4.A). Este anticorpo é, por conseguinte, considerado um marcador de malignidade se mais do que 25 a 30% são de células HBME-1 positivas (Vielh *et al.* 2006).

### **C. Citoqueratina 19 - Ck19**

Ck19 é uma citoqueratina de elevado peso molecular que constitui um marcador sensível, mas não específica do PTC. A sensibilidade é maior em lesões da variante clássica e, portanto, não pode ser útil quando ela é mais necessária, na variante folicular e em lesões oncocíticas com atipia nuclear (Saleh *et al.* 2010). Este marcador é também fortemente expresso em tecido tireoidiano normal comprimido em torno de lesões, em tireoidite

linfocítica crônica, e em áreas reativas de tumores benignos, geralmente ao redor do local da biópsia anterior; portanto, a sua especificidade é muito pobre (Figura 4.B). No entanto, a presença de positividade para CK 19 generalizada em uma borda de lesão pode ser útil para apoiar o diagnóstico de PTC (Al-Brahim *et al.* 2006).



**Figura 4.** A, HBME-1 demonstra coloração membranosa e citoplasmática forte em carcinoma papilífero de tireóide. B, Coloração da CK 19 no carcinoma papilífero da tireóide com marcação citoplasmática difusa. Observe a compressão adjacente dos folículos benignos também corados com CK 19, um recurso que pode ser uma armadilha.

Fonte: *Papillary Thyroid Carcinoma, An Overview.* Al-Brahim *et al.* 2006.

#### D. Galectina-3

Galectina-3 é um membro da família de lectina que é expressa por células inflamatórias epiteliais. Esta é uma proteína de adesão celular expressa pelas células de neoplasias malignas da tireóide (Vielh *et al.* 2006) e tem sido promovida como um marcador de malignidade na tireóide, no entanto, a sua expressão em alguns casos de bócio multinodular e tireoidite limita a sua aplicação (Al-Brahim *et al.* 2006). Sua sensibilidade varia de 87 a 100% e especificidade é elevada, da ordem de 94% (Saleh *et al.* 2010; Vielh *et al.* 2006). É considerada por alguns autores, como uma imunomarcagem bastante discriminada como primeira linha para classificar as lesões citologicamente suspeitas ou indeterminadas (Vielh *et al.* 2006).

### **E. Factor Transcrição da Tiróide -1 (TTF-1)**

TTF-1 (Fator Transcrição da Tireóide -1) é uma proteína reguladora da expressão de tiroglobulina, da tireoperoxidase e do simporte Na / I, sendo uma molécula essencial para o bom funcionamento da tireóide. É, por conseguinte, como a tireoglobulina, um marcador de células da tiroide. Mais frequentemente expresso em lesões benignas, ele está presente nos tumores da tireóide, principalmente se carcinomas forem dos tipos papilíferos, foliculares ou pouco diferenciados e podem ser positiva em alguns carcinomas medulares e em tumores oncocítico. Raramente utilizado nas citologias de lesões tireóidianas (Vielh *et al.* 2006).

## **IV. Marcadores Moleculares**

As alterações moleculares subjacentes do PTC têm sido extensivamente estudadas e desempenham um papel importante na compreensão da patogênese e do comportamento clinico-patológico da doença. Essas alterações também podem proporcionar marcadores de diagnóstico e de prognóstico que podem ser aplicadas para o diagnóstico preciso das lesões limítrofes e para melhoria da sensibilidade e especificidade da citologia pré-operatória (Al-Brahim *et al.* 2006).

### **A. Rearranjo de RET/PTC**

O proto-oncogene RET codifica o receptor de membrana de um fator de crescimento das células nervosas. Esta é uma proteína do receptor de tirosina-quinase que é capaz de transformar uma célula normal em células da tireóide superexpressas. A sua expressão é zero ou muito baixa em células da tiroide normal ou nódulos benignos (Al-Brahim *et al.* 2006; Vielh *et al.* 2006). É expressa em células derivada da crista neural e no rim. No entanto, RET está envolvido em um certo número de rearranjos conhecidos como RET / PTC que têm sido implicados na processo da carcinogênese do PTC. Entre os marcadores moleculares da PTC, os oncogenes com um papel patogênico no mecanismo de transformação celular da tireóide são mais promissores. Rearranjos do gene RET em PTC (RET / PTC) foi um dos primeiros oncogenes humano descoberto e foi o oncogene primeiro proposto como um marcador para este tumor (Marotta *et al.* 2011).

Sabe-se que splicing alternativo de RET ocorre, levando a três isoformas da proteína diferindo na sequência após um sítio de splicing C-terminal: RET9, RET43 e RET51 (Al-Brahim *et al.* 2006; Vielh *et al.* 2006). Pelo menos 10 rearranjos de RET / PTC foram já descritos, RET/PTC1 e RET/PTC3 sendo os mais frequentes (Guerra *et al.* 2011; Goncalves *et al.* 2011; Marotta *et al.* 2011). Estes rearranjos RET são restritos para a glândula tireóide e são específicos para PTC. Os rearranjos RET / PTC são considerados eventos precoces na carcinogênese, presente em alta frequência mesmo em microcarcinoma (Al-Brahim *et al.* 2006).

No entanto, o entusiasmo inicial foi atenuado pelo achado de RET / PTC em lesões benignas, incluindo Tireoidite de Hashimoto (HT) e adenomas. A constatação de que a expressão de RET / PTC não é absoluta como marcador do PTC levanta preocupações em relação a sua utilidade clínica nas PAAF inconclusivas (Guerra *et al.* 2011; Al-Brahim *et al.* 2006; Goncalves *et al.* 2011).

## **B. Mutações BRAF**

BRAF é uma proteína quinase que tem um papel importante na proliferação celular, diferenciação, e morte celular programada. Mutações ativadoras de BRAF foram encontradas inicialmente em câncer de cólon humano e melanoma maligno (Nucera *et al.* 2010; Das *et al.* 2010). Estudos tem demonstrado que o BRAF também é mutado em PTC com alta frequência (Tang *et al.* 2010). A mutação mais frequente é o BRAF-V600e e ela provoca o aumento da atividade da quinase gerando maior proliferação celular (Al-Brahim *et al.* 2006). As mutações BRAF são mais frequentemente associada com a variante clássica e, como geralmente essa variante não levanta grades dúvidas diagnósticas, eles não necessitam dessa tecnologia auxiliar, mas pode ser útil para amostras de citologia de diagnósticos duvidosos (Tang *et al.* 2010; Al-Brahim *et al.* 2006). As mutações de BRAF são associadas a características clínicas mais agressivas, tais como extensão extracapsular, recidivas mais frequentes e metástases à distância (Xing 2007). Além do mau prognóstico no PTC, a mutação de BRAF predispõe o tumor à perda de diferenciação, com possível transformação para carcinoma anaplásico e progressão da doença (Nucera *et al.* 2010; Tang *et al.* 2010).

### **C. Mutações em P63**

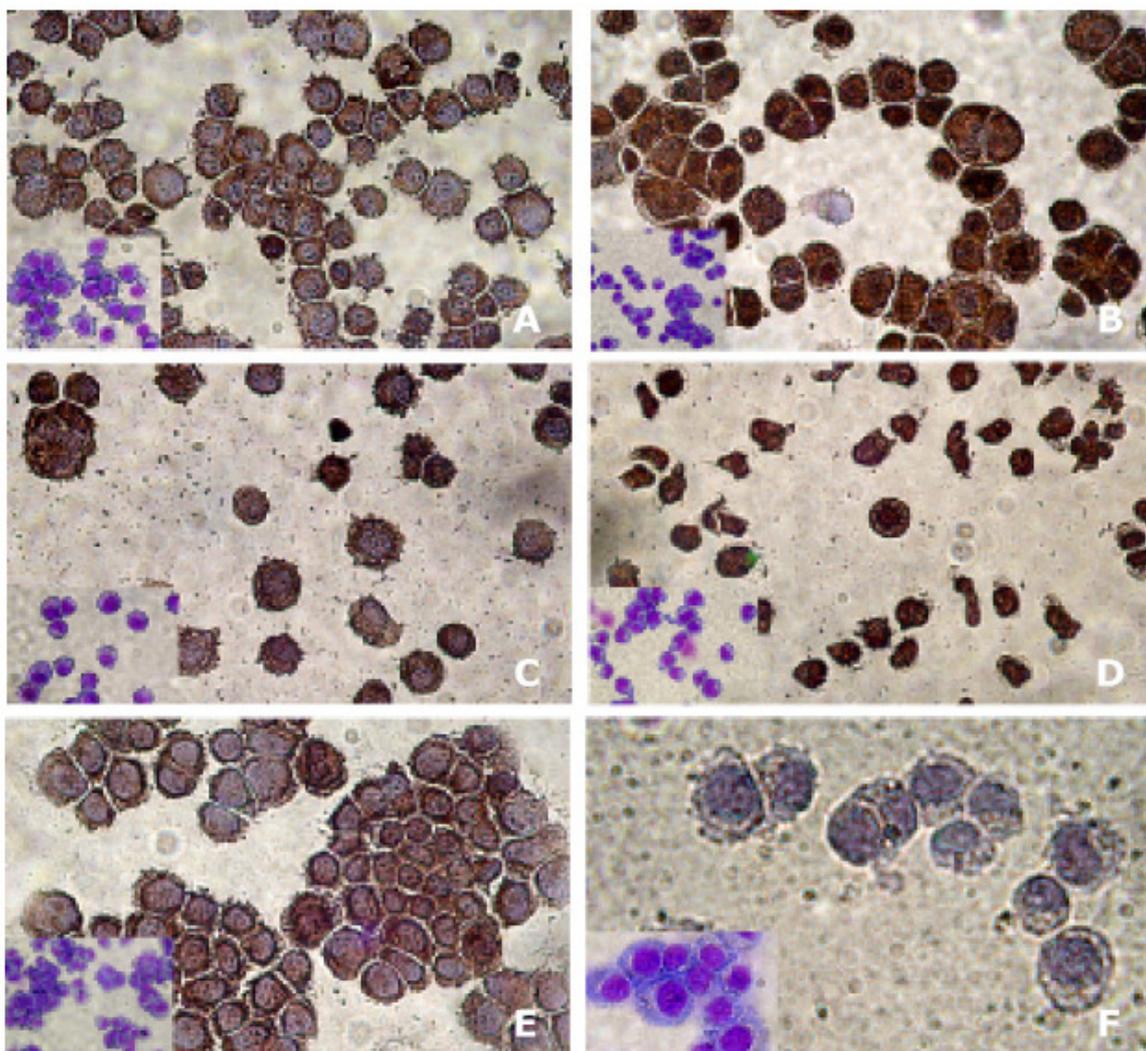
O P63 é um fator de transcrição nuclear, (El Demellawy *et al.* 2008) homólogo do gene p53, e é postulados para regular o comportamento de células escamosas (Vrabie *et al.* 2009). É sempre expressa nas células basais, escamosa e mioepiteliais (El Demellawy *et al.* 2008). Vrabie *et al.* 2009 demonstrou com imunohistoquímica uma positividade de 81,8% em focos de PTC , enquanto que a expressão do p63 foi negativo em condições normais tecido tireoidiano, bócio nodular e adenomas folicular oncocítico. Positividade foi rara e fraca em adenomas foliculares. O achado de p63 em ninhos sólidos benignos e Tireoidite Hashimoto (HT) suporta uma possível relação entre essas estruturas, a HT e PTC (Vrabie *et al.* 2009 ). P63 se mostrou bastante específico para o diagnóstico de PTC mas menos sensível (El Demellawy *et al.* 2008). P63 é detectado em agregados e ninhos sólidos de células, e a elevada percentagem de PTC com focos positivos de p63 parece distinguir PTC de outras neoplasias originárias da tiroide (Vrabie *et al.* 2009).

## 1.2 Forkhead Box Protein 3 (FOXP3)

FOXP3 pertence à família de fatores de transcrição *forkhead Box* (FOX), caracterizada por um domínio *forkhead* (FKH), de ligação ao DNA, altamente conservado, descrito como uma “hélice alada” (Martin *et al.* 2010). Localizados nos linfócitos T-reguladores (célula Treg), o FoxP3 tem seu papel no desenvolvimento e controle celular (Ghebeh *et al.* 2007). As células T reguladoras têm como principal ação proteger as células do organismo de reação autoimune, inflamação e destruição tecidual, promovendo um bloqueio das células T, sendo o FOXP3 a chave principal para essa regulação. (Hinz *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2009). O mecanismo no qual as células Treg agem na imunossupressão é através da inibição de contato célula-célula, e na produção de citocinas sendo a mais importante a interleucina-10 (IL-10), e o fator de transcrição beta (TGF- $\beta$ ). (Merlo *et al.* 2009; Hinz *et al.* 2007). A baixa expressão de FOXP3 em células Treg CD4 e CD25 tem predisposto a inúmeras doenças autoimunes (Zhou *et al.* 2009). Já na presença de alterações na expressão do FOXP3, trabalhos demonstram que este poderia ser um fator primordial para que as células tumorais escapassem da imunovigilância das células linfóides (Karanikas *et al.* 2008, Ghebeh *et al.* 2007) (Figura 5). Tenta-se provar se as células tumorais desenvolveram um programa de citocinas e expressão de quimiocinas, alterando a expressão do FOXP3, impedindo que se produza a IL-2 pelas células Treg, importante na resposta imune anti-tumor, proibindo assim, a entrada das células imunovigilantes no local do tumor, e sua apoptose. (Schreiber 2007, Ahmadzadeh *et al.* 2006). Outro dado importante seria a ligação da inflamação crônica e o desenvolvimento de câncer e sua progressão. A inflamação favoreceria a expansão das células Treg no tecido sendo o primeiro passo para perpetuação das células cancerígenas. (Kiniwa *et al.* 2007). No sangue periférico de pacientes com câncer foi demonstrado uma alta densidade de células Treg. (Michel *et al.* 2008).

Na indução de células T regulatórias, citocinas provavelmente contribuem para um ambiente imunossupressor que promove a expressão de FOXP3 (French *et al.* 2010). Têm sido observadas discrepâncias onde o FOXP3 é visto tanto como fator importante para inicialização do câncer, como também teria um papel na evolução, sendo adotado como um indicador de mau prognóstico (Ladoire *et al.* 2009). Exemplo disto é a presença do

B7-H1 uma molécula que tem na sua função induzir anergia e apoptose dos linfócitos T, sendo um dos fatores para o aparecimento de câncer, junto com a supressão via FASL. Estes foram encontrados em 50% do paciente com câncer de mama sendo que na maioria houve um alto risco de malignidade quando associado com FOXP3 (Ghebeh *et al.* 2007; Kilincet *et al.* 2009; Hinz *et al.* 2007).



**Figura 5.** Coloração FoxP3 em imuno-histoquímica de células tumorais. **A:** Melanoma, expressão citoplasmática predominante. **B:** Adenocarcinoma de Pulmão, expressão citoplasmática e nuclear. **C:** Adenocarcinoma de Cólon, expressão citoplasmática predominante. **D:** Leucemia Linfoblástica de células T; expressão citoplasmática e nuclear. **E:** Adenocarcinoma de Mama, expressão citoplasmática predominante. **F:** Não expresso em células B EBV-transformadas.

*Fonte: Foxp3 expression in human cancer cells. Karanikas et al. 2008.*

A expressão de FOXP3 foi inicialmente considerada como restrita a células e tecidos hematopoiéticos; no entanto, foi relatada recentemente uma marcação com anti-FOXP3

de tecido mamário normal e carcinomatoso. Além disso, foi verificada uma expressão de FOXP3 em 60% dos adenocarcinomas pancreáticos e em todas as linhagens celulares de câncer de pâncreas analisadas (Merlo *et al.* 2009). A expressão dessa proteína em tumores foi associada à menor probabilidade de sobrevida global e esse risco aumenta com a elevação da densidade da imunomarcção para FOXP3 (Merlo *et al.* 2009). A localização subcelular heterogênea de FOXP3 no carcinoma de mama traduz a presença de diferentes formas modificadas pós-translacionais de FOXP3. Novas investigações são necessárias para averiguar se essas modificações são funcionalmente relevantes (Merlo *et al.* 2009). Na mama e na próstata humana, a diferença notável entre as células epiteliais normais e cancerosas quanto à expressão de FOXP3 sugere fortemente uma relação entre o *down-regulation* de FOXP3 e o desenvolvimento de câncer (Martin *et al.* 2010). A expressão de FOXP3 serviu para discriminar o risco prognóstico de pacientes com câncer de mama e linfonodo negativo, uma vez que a sobrevida global de pacientes linfonodo-negativos/FOXP3-positivos foi significativamente inferior àquela de pacientes linfonodo-negativos/FOXP3-negativos. (Merlo *et al.* 2009)

A expressão de FOXP3 foi significativamente associada à positividade de linfonodos e de MIB-1, enquanto nenhuma associação foi encontrada entre a expressão de FOXP3 e células tumorais e parâmetros prognósticos (tamanho do tumor, *status* do receptor de estrogênio, *status* linfonodal, tipo de quimioterapia, resposta histológica após quimioterapia neoadjuvante, mitoses, necrose e grau histológico) ou com a idade ou outro parâmetro biológico, com exceção do grau do tumor (Ladoire *et al.* 2009; Merlo *et al.* 2009).

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Seleção de Biópsias**

Entre 2008 e 2010 foram realizadas 250 Tireodectomias Totais no Serviço de Cirurgia do Hospital São Rafael, Salvador-BA, Brasil, por diagnóstico de Carcinoma Papilífero da Tireoide (PTC). Destes, foram selecionados 30 casos do banco de dados do Hospital, randomizados a partir de uma tabela de randomização, previamente gerada através do Random Allocation Software.

### **2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão**

Constituíram os eventos incluídos no estudo os casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide com e sem Tireoidite da Hashimoto que apresentaram diagnóstico confirmado, por dois patologistas, de forma isolada e considerados excluídos os casos com dados incompletos ou sem os blocos de parafina para recorte.

### **2.3 Processamento e Análise do Material**

Foram selecionados os casos de PTC com e sem HT que apresentaram diagnóstico confirmado, por dois patologistas, de forma isolada. Foi excluído um caso com dados incompletos. As biópsias foram fixadas em parafina. A imunoistoquímica foi realizada com recorte das lâminas previamente silanizadas, recuperação antigênica com EDTA PH9 e marcação com Anti-FOXP3 antibody [mAbcam 22510] Abcam® Cambridge, UK. A revelação foi feita com estreptovidina por trinta minutos em solução phosphate buffered saline (PBS) com substrato mais cromógeno revelador diaminobenzidina (DAB). Após lavagem com água destilada o material foi contra-corado com Hematoxilina de Harris.

As lâminas foram consideradas positivas quando apresentavam coloração evidente nas

células do PTC observados em quatro campos de 400x. Cada caso foi posteriormente classificado como positivo difuso se mais de 50% das células do PTC apresentaram coloração, positivo focal se menos de 50% das células estavam coradas e considerado negativo se não foi observada coloração no PTC. Foi também analisada a expressão de FOXP3 em áreas de HT. Todas as lâminas foram vistas por dois patologistas isolados e os casos discordantes foram revistos e classificados de comum acordo.

### 3. Resultados

Dos vinte e nove (100%) pacientes diagnosticados com carcinoma papilífero da Tireóide, vinte e três (79.3%) do sexo feminino e seis (20.7%) do sexo masculino, a média de idade de quarenta e dois anos. Dezoito (62.1%) foram diagnosticados apenas com PTC e 11 (37.9%) tinham tireoidite de Hashimoto concomitantemente. (Tabela 1) No processo de Imunoistoquímica realizada com FOXP3 (figura 6) foi observado que oito (27.6%) pacientes apresentaram resultado de FOXP3 negativo enquanto que vinte e um (72.4%) pacientes apresentaram resultado de FOXP3 positivo (Gráfico 1).

<b>Número de Casos</b>	<b>N= 30</b>
<b>Sexo</b>	<b>Feminino 23 (79.3%)</b> <b>Masculino 6 (20.7%)</b>
<b>Média de Idade</b>	<b>42 anos</b>
<b>PTC</b>	<b>18</b> (62.1%)
<b>PTC+TH</b>	<b>11</b> (37.9%)
<b>FoxP3 +</b>	<b>21</b> (72.4%)
<b>FoxP3 -</b>	<b>8</b> (27.6%)

Tabela 1

Para facilitar a comparação do PTC sem associação e com associação com tireoidite de Hashimoto, a análise das reações positivas e negativas com o FOXP3 foi realizada separadamente para cada uma dessas variáveis. Calculado com base na amostra global de vinte e nove amostras, dos pacientes acometidos por PTC isolado, cinco (17,24%) apresentaram resultado negativo à reação com foxp3 e treze (44,81 %) se mostram positivos à reação, enquanto que, dos pacientes com TH concomitante ao PTC, três (10,34%) obtiveram resultado negativo na reação com o FOXP3 e oito (27,57%) foram

positivos. Dos casos positivos diagnosticados apenas com PTC seis (20,68%) se apresentaram de forma positivo focal e sete (24,13%) como positivo difuso. Dos positivos com diagnóstico conjunto de PTC e HT, dois pacientes (6,89%) obtiveram resultado positivo focal e seis (20,68%) positivo difuso na reação para FoxP3. (Tabela 2)

De forma mais estratificada, calculando todas as variáveis separadamente nos grupos de PTC isolado e TH concomitante ao PTC pudemos observar algumas semelhanças, como frequência da expressão, sugerindo que independente do processo de tireoidite, a expressão do FoxP3 se dá na zona de PTC. Nessa análise foi evidenciada uma diferença discreta em relação ao tipo de expressão de FoxP3 em cada grupo distinto, podendo observar-se uma predominância de Marcação positivo difusa no grupo de HT+PTC e uma relação equilibrada entre a apresentação da expressão difusa e focal no grupo de PTC isolado. Devido ao n amostral reduzido, complementar o estudo com novas amostras seria essencial para que pudéssemos concluir que existem reais diferenças entre os grupos na apresentação do marcador. (Tabela 3)

	<b>PTC</b>	<b>PTC + HT</b>
<b>FOXP3 Negativo</b>	<b>5</b> (17,24%)	<b>3</b> (10,34%)
<b>FOXP3 Positivo</b>	<b>13</b> (44,81%)	<b>8</b> (27,57%)
<b>FOXP3(+) Difuso</b>	<b>7</b> (24,13%)	<b>6</b> (20,68%)
<b>FOXP3(+) Focal</b>	<b>6</b> (20,68%)	<b>2</b> (6,89%)

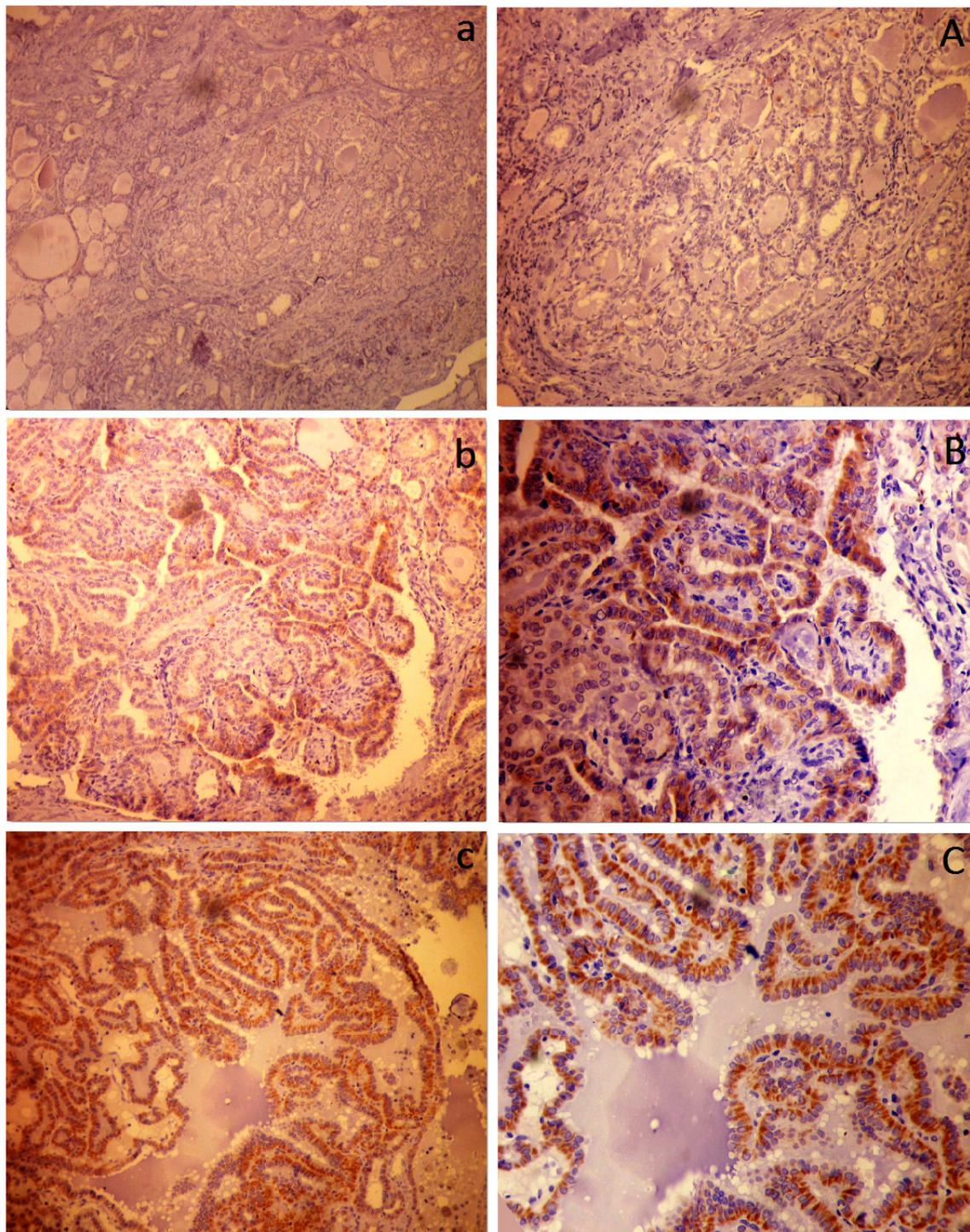
Tabela 2

Nas regiões da glândula onde havia apenas Tireoidite de Hashimoto (HT) e em zonas de glândula sem alteração (controle interno) não houve positividade para FoxP3, sugerindo especificidade desse reagente em relação a marcação isolada do PTC (Figura 7).

<b>Variáveis</b>	<b>PTC   n=18</b>	<b>PTC + HT   n=11</b>
<b>Idade</b>	38,6	47,4
<b>Sexo</b>	Feminino = 13   72% Masculino = 5   28%	Feminino = 10   91% Masculino = 1   9%
<b>Frequência de Expressão do FoxP3</b>  <i>p= 0,97</i>	Positivo = 13   72% Negativo = 5   28%	Positivo = 8   73% Negativo = 3   27%
<b>Frequência de Expressão do FoxP3 em relação ao Sexo</b>  <i>p=0,09</i>	Positivo: n=13 Feminino: 11   85% Masculino: 2   15%  Negativo n=5 Feminino: 2   40% Masculino: 3   60%	Positivo: n=8 Feminino: 7   87,5% Masculino: 1   12,5%  Negativo n=3 Feminino: 3   100% Masculino: 0   0%
<b>Intensidade de Expressão de Foxp3</b>  <i>p= 0,62</i>	Difuso: 7   54% Focal: 6   46%	Difuso: 6   75% Focal: 2   25%

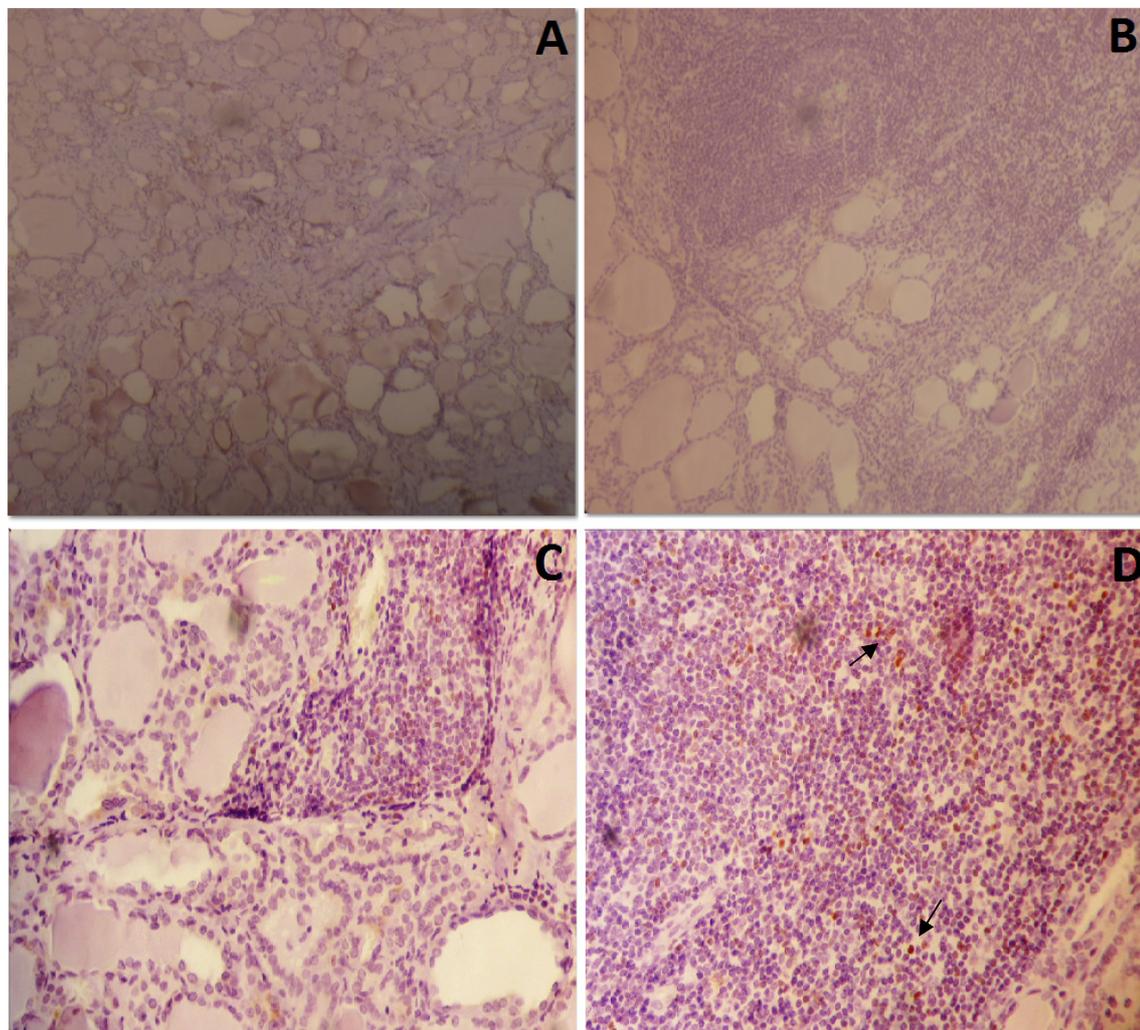
Tabela 3

### 3.1 Imunohistoquímica – FoxP3 no PTC



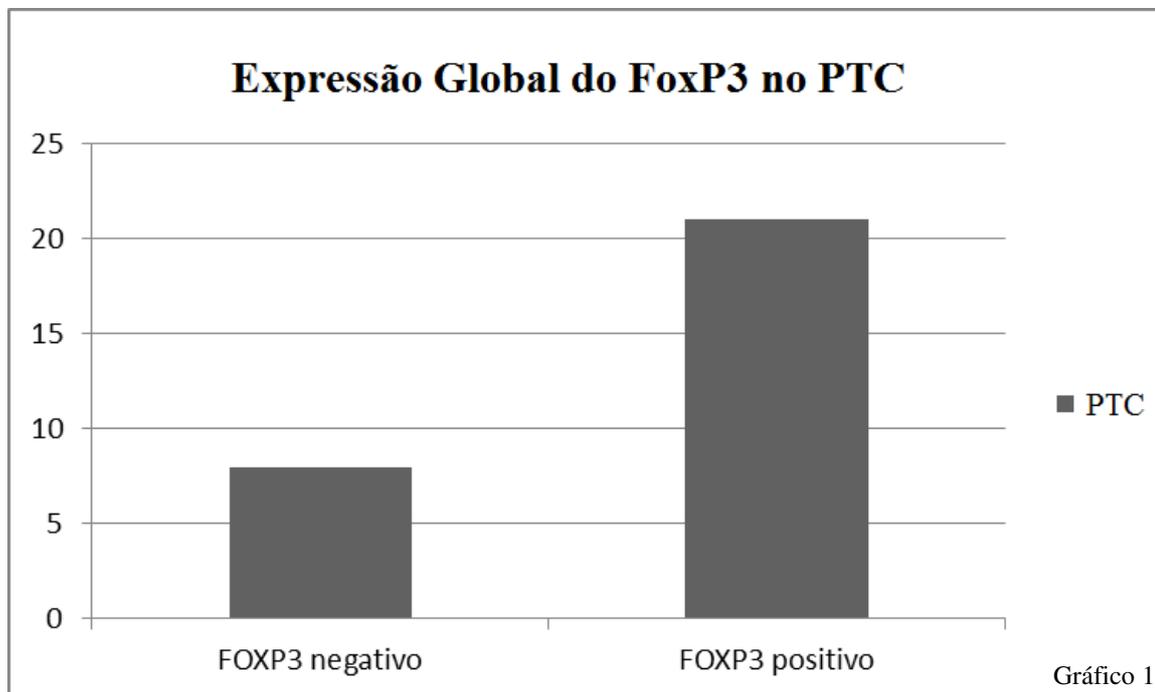
**Figura 6.** Imunohistoquímica com marcador de FoxP3. Ausência de marcação (FoxP3 negativo) no aumento de 10x (a) e no aumento de 40x (A); Marcação positivo focal, com menos de 50% do campo corado, no aumento de 10x (b) e no aumento de 40x (B); Marcação positivo difuso, com mais de 50% do campo corado, no aumento de 10x (c) e no aumento de 40x (C).

### 3.2 Imunohistoquímica – FoxP3 na HT

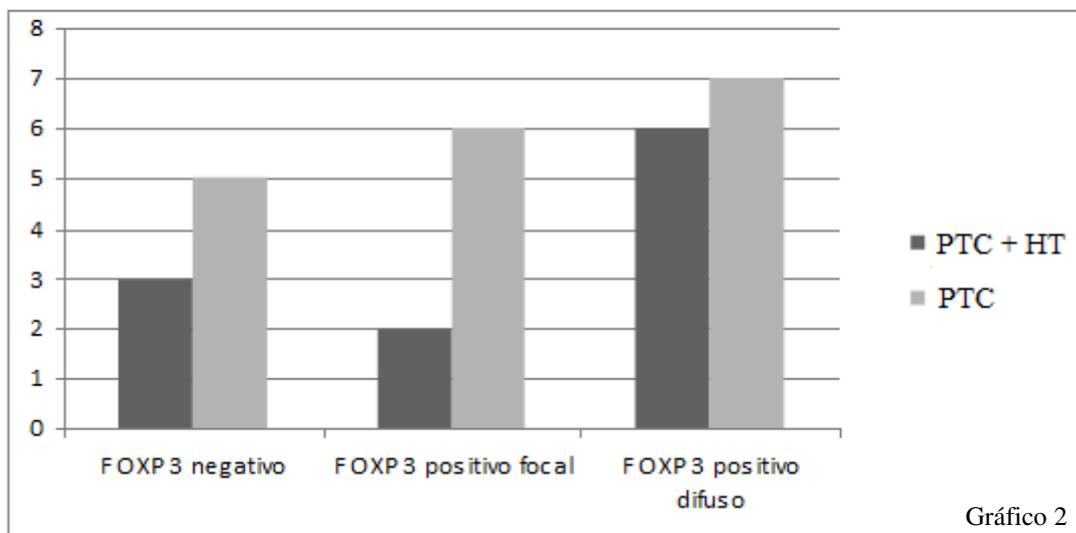


**Figura 7.** Imunohistoquímica com FoxP3. **A,** Sem marcação em tecido tireoidiano normal; Ausência de marcação por FoxP3 em tireóide apresentando infiltrado linfocitário de Tireoidite de Hashimoto (HT) em aumento de 10x (**B**) e 40x (**C**); **D,** Marcações pontuais de linfócitos FoxP3 + em infiltrado linfocitário de Tireoidite de Hashimoto, indicando presença de Linfócitos T regulatórios (Treg).

### 3.3 Gráficos



### Estratificação da Expressão do FoxP3 no PTC



## 4. Discussão

A associação entre PTC e HT tem sido amplamente documentada tanto em estudos epidemiológicos como morfológicos (Cipolla *et al* 2005). O FoxP3 é um marcador de células T regulatórias e tem também sido detectado em tumores malignos de vários sítios (Karanikas *et al* 2008). No presente estudo a expressão desta molécula em tecido tireoidiano de pacientes com PTC apresentando ou não HT associado foi avaliada. Expressão difusa ou focal de FoxP3 foi fortemente associada a células cancerosas, desde que não foi documentado em áreas com tecido tireoidiano normal e foi somente detectado em linfócitos Treg nas áreas de HT.

A relação entre o PTC e a HT sugere uma associação não apenas acidental. Nestes casos a presença de um processo inflamatório crônico poderia induzir a ativação de genes levando a uma transformação maligna (Cipolla *et al* 2005). Embora o FoxP3 seja documentado em células malignas, esta molécula é um marcador de células T regulatórias (Hori *et al* 2003). As doenças autoimunes como a HT estão associadas à falha nos mecanismos de regulação da resposta imune; não pode ser afastada a possibilidade de que durante o processo inflamatório crônico, estas células pudessem estar sendo recrutadas para o sítio inflamatório. Neste caso como consequência poderia haver diminuição da defesa contra células neoplásicas e desenvolvimento de câncer. Todavia nossos dados claramente mostram que a expressão de FoxP3 está associado ao PTC mas não à HT. A relação de FoxP3 com câncer tem sido documentado em cultura de células do carcinoma de mama (Zhou *et al* 2009), próstata (Wang *et al* 2009), pâncreas e melanoma (Karanikas *et al* 2008). A expressão de Foxp3 em células malignas do epitélio pancreático foi

confirmada em 12 de 39 casos, e a coloração era principalmente citoplasmática e nuclear; células do ducto pancreático estavam desprovidas de expressão do FoxP3. Foxp3-positivo foi encontrado em tumores com infiltração linfocitária. (Hinz S et al., 2007), A expressão nuclear de FOXP3 é normal nas células do epitélio prostático humano, mas sofrem mutações e são perdidas em aproximadamente 70% dos cânceres prostáticos humanos. *FOXP3* é frequentemente inativado nas amostras de câncer de próstata por deleção (14%) ou por mutação somática (25%) (Wang *et al.*, 2009). Recentes achados de Cunha LL *et al.* encontrou maior marcação citoplasmática do que nuclear em imunohistoquímica com FoxP3 em lesões malignas comparadas com nódulos benignos, o que sugere que a localização citoplasmática de FoxP3 pode ser um resultado da característica de elevada taxa de mutação de transformação (Cunha LL et al., 2012)

No presente trabalho foi observado que a expressão significativa de FoxP3 em biópsias da tireóide evidenciada através da imunohistoquímica pode ter um papel de marcador de PTC aplicável em casos duvidosos de PTC.. Nossos dados indicam que FoxP3 é um bom marcador de PTC e que não há diferença de expressão de FoxP3 no carcinoma com e sem HT.

#### **4.1 Foxp3 como marcador de PTC**

A expressão de FOXP3 em tecidos tumorais, como descrito por Karanikas V. e Salama P., foi evidenciado no presente estudo através de Imunohistoquímica realizada com anticorpos específicos para FOXP3. Obtivemos resultado positivo difuso ou focal em 21 casos de PTC, demonstrando a positividade em 72,4% das amostras. Esse resultado aponta a possibilidade de uma nova técnica de diagnóstico precisa de PTC, na tentativa de escapar dos laudos patológicos inconclusivos de algumas biópsias de Tireóide, que resultam em procedimentos invasivos, e com chances de erro. Desta forma, podemos concluir que a

positividade do Foxp3 está significativamente associada ao surgimento do câncer, podendo ser utilizado como um identificador confiável nas áreas suspeitas de malignidade. Soma-se a isto o fato de que o foxp3 não está presente nas amostras de tireóides normais. O primeiro passo para a utilização do foxp3 como marcador cancerígeno já foi dado, fato que futuramente ajudará nos diagnósticos cada vez mais precisos de PTC e diminuição dos casos suspeitos e/ou indeterminados.

#### **4.2 Diferença na Expressão de FoxP3 - PTC x TH**

A relação entre pacientes com Carcinoma Papilífero da Tireóide (PTC) e Tireoidite de Hashimoto (HT), sugere uma analogia não apenas acidental, mas a presença de um processo inflamatório crônico no qual a ativação de genes pode ser um fator de transformação maligna. Esta analogia foi utilizada como subsídio para suscitar a dúvida se haveria diferença significativa na expressão de foxp3 em pacientes com PTC isolado ou em associação com TH.

Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas na expressão do FoxP3 por PTCs seguidos ou não de TH, evidenciando que a expressão do FoxP3 no carcinoma papilífero independe da coexistência da tireoidite. Este fato corrobora para a hipótese de que a TH isolada não provoca a expressão do marcador e que a apresentação do FoxP3 está relacionada estritamente com a presença ou não de PTC.

#### **4.3 Diferenciação de Nódulos Epiteliais Atípicos de TH e PTC**

Na TH podem existir pequenos nódulos sólidos que, histologicamente, são conflitantes com diagnóstico de PTC pela existência de pequenas atipias. Neste contexto, surgem situações de dificuldade nas diferenciações morfológicas e imunofenotípicas na interpretação desses pequenos focos de atipia na TH.

Descritos como minúsculas atipias no epitélio com características nucleares inconclusivas, eles são, na verdade, ninhos sólidos de células (SCNs). A capacidade destes SCNs para mimetizar microcarcinoma papilífero da tireóide é bem reconhecido, especialmente na glândula tireóide com tireoidite crônica linfocítica.

Os SCNs são divididos em dois tipos, relacionados às suas características histológicas. Os SCN tipo 2 são compostos por células semelhantes a epidermóides e mais facilmente distinguíveis do microcarcinoma papilífero da tireóide. Em contrapartida, pode ser mais difícil diferenciar os SCNs tipo 1 do microcarcinoma. Neles as células detêm núcleos ovais com cromatina limpo e ocasionais sulcos nucleares. SCNs Tipo 1 são frequentemente rodeados por membrana basal eosinofílica. Quando as técnicas habituais são inconclusivas, marcadores imunoistoquímicos, como o p63 e HBME1 são utilizados. Os SCNs são fortemente positivos para p63. Sendo o tipo 1 positivo para coloração pelo HBME1, enquanto que SCNs tipo 2 é negativo (Seethala *et al.* 2010). A utilização do FoxP3 como marcador teria grande importância em casos como ninhos sólidos de células (SCNs), a aplicação de imunoistoquímica para p63, HBME1 e FoxP3, poderia alcançar uma maior especificidade na diferenciação entre os SCNs da tireoidite e o PTC. A utilização do FoxP3 como marcador teria grande importância em casos como SCNs, nos quais, com a união das imunoistoquímicas para p63+HBME1 e FoxP3, se alcançaria uma maior especificidade na diferenciação entre os SCNs da tireoidite e o PTC. Desta forma, pode-se evitar que procedimentos radicais como a tireoidectomia, sejam realizados desnecessariamente em pacientes onde as minúsculas atipias nucleares inconclusivas foram confundidas com o Carcinoma Papilífero da Tireóide.

#### **4.4 Mecanismos de Carcinogênese do Foxp3**

Mecanismos de regulação da expressão de foxp3 em células tumorais permanecem pouco estudados. No câncer de mama, o foxp3 funciona como supressor da proteína oncogênica SKP2. A transfecção de Foxp3 resultou em aumento de p27 que é o alvo principal do Skp2. (Zuo *et al.* 2007). O aumento da expressão de foxp3 foi documentado apenas em células expressando wild-type p53. (Martin *et al.* 2010)

O Foxp3 foi relacionado com o câncer de próstata através de mecanismos moleculares de repressão do gene MYC e inativação somática do Foxp3. (Wang *et al.* 2009)

No câncer de pâncreas, as células expressaram Foxp3 citoplasmática e nuclear sugerindo que a presença em células cancerígenas podem disparar um mecanismo de evasão imune. O melanoma maligno também apresenta positividade para Foxp3. (Martin *et al.* 2010)

#### **4.5 Possibilidade de Nova Técnica no Diagnóstico de PTC**

No presente trabalho foi observado que a expressão significativa de FoxP3 em biópsias de tireóide evidenciada através da imunohistoquímica, serve como marcador de PTC e pode ser uma técnica usada nos casos duvidosos de carcinoma. Essa evidência demonstra, então, uma nova opção de artifício diagnóstico para casos borderline, com pequenas atipias e que levantam suspeitas ao patologista, se apresentando como uma alternativa na conclusão do laudo de PTC.

Sendo este o primeiro trabalho realizado com o objetivo de expor a relação do PTC isolado ou associado à TH com a expressão do FoxP3, e tendo observado que a imunohistoquímica para este marcador se mostrou realmente eficaz nos casos de PTC, faz-se necessário ressaltar a importância da continuidade do estudo para a reprodução e confirmação dos dados de positividade do foxp3, como identificador de câncer na tireoide.

## 5. Summary

CORREIA, TC. [FoxP3 expression in papillary thyroid carcinoma (PTC)]. Salvador; 2012. Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

**Introduction:** Tumors of the thyroid are common endocrine diseases in the population between 20 and 60 years old where about 40% have thyroid nodules, and only 5% to 10% of these are malignant, mostly composed of papillary thyroid carcinomas (PTC), is today the most common endocrine malignancy and accounts for more than 70% of all thyroid cancers. The FOXP3 is a member of the family of transcriptional regulators, which is involved in regulating the development and immune system function. It is expressed in normal and cancer cell non-lymphocytic. The FOXP3 expressed in various tissues is not only epithelial tumor, such as lung, breast, colon, but also in the original tissue, such as melanoma and leukemia. Thus, this study aims to identify the presence of this protein in papillary thyroid carcinoma. **Methodology:** In 50 cases of PTC were selected 30 from a randomization table, being made FOXP3 immunohistochemistry with antibody. Excluding one case for lack of data. **Results:** Of the twenty-nine (100%) patients diagnosed with PTC, twenty-three (79.3%) were female and six (20.7%) were male, mean age of forty-two years. Eighteen (62.1%) were diagnosed only with PTC and 11 (37.9%) had Hashimoto's thyroiditis (HT) simultaneously. In the process staining was observed that eight (27.6%) patients had negative results of FOXP3 while twenty-one (72.4%) patients had a positive result of FOXP3. In gland regions where there were only HT and in areas of the gland without alteration (internal control) was not positive for FoxP3, suggesting specificity of this reagent in relation to marking isolated PTC. **Conclusion:** It is necessary to emphasize the importance of continuing the study for the reproduction of the data and confirmation of positive FOXP3 as identifier PTC.

**Key Words:** Thyroid Neoplasms, Thyroid Papillary Carcinoma, Tumor Markers, Immunohistochemistry, FoxP3.

## 6. Referências

1. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. Mar 15; 107 (6) :2409-14. 2006.
2. Al-Brahim N, Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med*. Jul; 130 (7) :1057-62. 2006.
3. Benvenga S. Update on thyroid cancer. *Horm Metab Res*, v. 40, n. 5, p. 323-8, 2008.
4. Camandaroba MPG, Mata LS, Almeida LB, Miranda JS, Neves MP. 4 Hashimoto Disease Linked to Thyroid Papillary Carcinoma: a Number of Cases de Casos *Revista Brasileira de Cancerologia* ; 55(3): 255-261. 2009.
5. Chrisoulidou A, Boudina M, Tzemailas A, Doumala E, Iliadou PK, Patakiouta F, Pazaitou-Panayiotou K. Histological subtype is the most important determinant of survival in metastatic papillary thyroid cancer. *Thyroid Res*. Jul 19; 4 (1) :12. 2011.
6. Cipolla C. et al. Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid carcinoma. *Am Surg*, v. 71, p. 874-8, 2005.
7. Cotran RS, Kumar V, Abbas F. O sistema endócrino, In: Robbins, SL, Contran, R.S, Kumar V, Abbas F. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1011-47. 2005.
8. Das DK, Sheikh M, Mallik MK, Sharma PN, Mannan AA, Sheikh ZA, Haji BI, George SS, Madda JP, Hussein S, Francis IM. Papillary thyroid carcinoma: How much should the surgeon read from Fine needle aspiration cytology reports? *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53(4):686-91, 2010.
9. El Demellawy D, Nasr A, Alowami S. Application of CD56, P63 and CK19 immunohistochemistry in the diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. *Diagn Pathol*. Feb 6; 3:5. 2008.
10. Eloy C, Santos J, Soares P, Sobrinho-Simões M. The preeminence of growth pattern and invasiveness and the limited influence of BRAF and RAS mutations in the occurrence of papillary thyroid carcinoma lymph node metastases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 28, 2011.

11. Eze OP, Starker LF, Carling T. The Role of Epigenetic Alterations in Papillary Thyroid Carcinogenesis. *Research Journal of Thyroid Research*, 895470, 2011.
12. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336, 2003.
13. French JD, Weber ZJ. et.al Tumor-Associated Lymphocytes and Increased FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cell Frequency Correlate with More Aggressive Papillary Thyroid Cancer. *95 (5): 2325*, 2010.
14. Fusco A, Santoro M. 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 51, n. 5, p. 731-5, 2007.
15. Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Elkum N, Al-Tweigeri T, Dermime S. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy, *BMC Cancer*. Feb 23;8:57, 2008.
16. Goncalves AP, Videira A, Maximo V, Soares P. Synergistic growth inhibition of cancer cells harboring the RET/PTC1 oncogene by staurosporine and rotenone involves enhanced cell death. *J Biosci*. Sep; 36 (4) :639-48. 2011.
17. Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Moretti MI, Deandrea M, Motta M, Limone PP, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. Prevalence of RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid nodules and its clinical application. *Endocr J*.; 58 (1) :31-8. 2011.
18. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, Grützmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger HD, Klöppel G, Kabelitz D, Kalthoff H. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*. Sep 1; 67 (17) :8344-50. 2007.
19. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061, 2003.
20. Iyer NG, Kumar A, Nixon IJ, Patel SG, Ganly I, Tuttle RM, Shah JP, Shaha AR. Incidence and significance of Delphian node metastasis in papillary thyroid cancer. *Ann Surg*. 2011.

21. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, Barda AK, et.al. Foxp3 expression in human cancer cells. *Journal of Translational Medicine*, 6:19, 2008.
22. Khanafshar E, Lloyd RV. The Spectrum of Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Advances in anatomic pathology*, 18:1, 2011.
23. Kilinc MO, Rowswell-Turner RB, Gu T, Virtuoso LP, Egilmez NK. Activated CD8+ T-effector/memory cells eliminate CD4+ CD25+ Foxp3+ T-suppressor cells from tumors via FasL mediated apoptosis. *J Immunol*. Dec 15; 183 (12) :7656-60, 2009.
24. Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, Thompson TC, Old LJ, Wang RF. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. Dec 1; 13 (23) :6947-58. 2007.
25. Ladoire S, Arnould L, Mignot G et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 125:65-72, 2010.
26. Lin JD, Hsueh C, Huang BY. Papillary thyroid carcinoma with different histological patterns. *Chang Gung Med J*. Jan-Feb; 34 (1) :23-34, 2011.
27. Loyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head & Neck Pathology* , 5(1):51-6, 2011.
28. Marotta V, Guerra A, Sapio MR, Vitale M. RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint. *Eur J Endocrinol*. Oct; 165 (4) :499-507. 2011.
29. Martin F, Ladoire S et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clinical Cancer Research* Apr 15;14(8):2413-20, 2008.
30. Martin F, Ladoire S, Mignot G et al. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*. v. 22: p. 4121-9, 2010.
31. Merlo A et.al. FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 27, n.11, p.1746-1752, 2009.

32. Michel S, Benner A, Tariverdian M, Wentzensen N, Hoefler P, Pommerencke T, Grabe N, von Knebel Doeberitz M, Kloor M. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*. Dec 2; 99 (11) 2008.
33. Neves Junior MP; Camandaroba MPG; Almeida MAC; Miranda JS. Thyroid papillary carcinoma and histologic variants linked to Hashimoto disease. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45 , n. 5, p. 389-393, outubro 2009.
34. Nikiforov YE. RET/PTC Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2040-2, 2006.
35. Nucera C, Lawler J, Hodin R, Parangi S. The BRAFV600E mutation: what is it really orchestrating in thyroid cancer?. *Oncotarget*. Dec; 1 (8) :751-6. 2010.
36. O'Neill CJ, Bullock M, Chou A, Sidhu SB, Delbridge LW, Robinson BG, Gill AJ, Learoyd DL, Clifton-Bligh R, Sywak MS. BRAFV600E mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer. *Surgery*, 148(6):1139-45, 2011.
37. Papillary Thyroid Carcinoma: Immunohistochemical. Disponível em: <<http://www.pathologyoutlines.com/>>. Acesso em: 20 de setembro de 2011.
38. Rhoden KJ et al. RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimotos thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2414-23, 2006.
39. Roberti A et al. Concomitance of Hashimotos thyroiditis and differentiated thyroid cancer. *Rev Col Bras Cir*, v. 33, n. 6, p. 345-9, 2006.
40. Rosai J. *Surgical pathology*. Philadelphia: C V Mosby; Thyroiditis; p.519-24. 2004.
41. Salama P et al. Tumor-Infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v.27, n.2, p.186-192, 2009.
42. Saleh HA, Jin B, Barnwell J, Alzohaili O. Utility of immunohistochemical markers

in differentiating benign from malignant follicular-derived thyroid nodules. *Diagnostic Pathology* 26; 5:9, 2010.

43. Schreiber TH. The Use of FoxP3 as a Biomarker and Prognostic Factor for Malignant Human Tumor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16:1931-1934, 2007.
44. Sclafani AP, Valdes M, Cho H. Hashimoto's thyroiditis and carcinoma of the thyroid: optimal management. *Laryngoscope* 1993; 103:845-9.
45. Seethala RR, Chiosea SI. Solid Cell Nests, Papillary Thyroid Microcarcinoma, and HBME1. *American Society for Clinical Pathology*, 134:167-170; 2010.
46. Strauss M, Laurian N, Antebi E. Coexistent carcinoma of the thyroid gland and Hashimoto's thyroiditis. *Surgery Gynecology & Obstetrics*, v. 157, n. 3, p. 228-32, 1983.
47. Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *J Chin Med Assoc.* Mar; 73 (3) :113-28. 2010.
48. Unger K et al. Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, n. 9, p. 4272-9, 2004.
49. Vielh P, Mansuet-Lupo A, Polivka M, Saada M, Cochand-Priollet B. [Update on thyroid immunocytochemistry and its value for managing patients with thyroid nodules]. *Ann Pathol.* Oct; 26 (5) :340-5. 2006.
50. Vierlinger K, Mansfeld MH, Koperek O, Nöhammer C, Kaserer K, Leisch F. Identification of SERPINA1 as single marker for papillary thyroid carcinoma through microarray meta-analysis and quantification of its discriminatory power in independent validation. *BMC Medical Genomics* 6;4:30, 2011.
51. Vrabie CD, Terzea D, Petrescu A, Waller M. The histopathology analysis of the diffuse sclerosing variant of the papillary carcinoma of the thyroid: a distinctive and rare form. *Rom J Morphol Embryol.* 50 (4) :743-8. 2009.
52. Vriens MR, Moses W, Weng J, Peng M, Griffin A, Bleyer A, Pollock BH, Indelicato DJ, Hwang J, Kebebew E. Clinical and Molecular Features of Papillary Thyroid Cancer in Adolescents and Young Adults. *Cancer* 15;117(2):259-67, 2011.

53. Wang L, Liu R, Li W et al. Somatic Single-hits Inactivate the X-linked Tumor Suppressor *FOXP3* in the Prostate. *Cancer Cell*. 16(4): 336–346, 2009.
54. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28:742-62.
55. Zhou X, Bucktrout SB, Jeker LT, Jeffrey A. Plasticity of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T cells. *Curr Opin Immunol*. June; 21(3): 281–285, 2009.
56. Zuo T, Liu R, Zhang H et al. *FOXP3* is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene *SKP2*. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 117, p 3765-73, 2007.

## 7. Anexo

	<b>COMUNICAÇÃO INTERNA</b>		<b>Data:</b>	08/03/07
			<b>Nº</b>	<b>06/07</b>
<b>De:</b>	CEP - Comitê de Ética em Pesquisa	<b>Para:</b>	Dr. Murilo Neves Pesquisador Principal	
<b>Ref.</b>	Projeto de Pesquisa Nº 08/07			

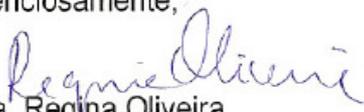
Prezado pesquisador:

Cumpra-se cientificá-la que o **Projeto de pesquisa nº 08/07**, intitulado "Carcinoma Papilífero da Tireóide Associado a Tireoidite de Hashimoto", foi apreciado em 08/03/2007, em reunião ordinária deste Comitê, tendo sido aprovado.

Reiteramos a necessidade de ser encaminhado o primeiro relatório periódico até o dia 30/08/2007 e os demais relatórios deverão ser encaminhados ao CEP a cada seis meses. Caso o projeto seja concluído antes do vencimento de novo período semestral, favor encaminhar o relatório final.

Estamos à disposição para esclarecimentos, que se fizerem necessários, através do telefone 3281-6484 ou pelos e-mails [cep@hsr.com.br](mailto:cep@hsr.com.br) ou [edna.lima@hsr.com.br](mailto:edna.lima@hsr.com.br)

Atenciosamente,

  
Dra. Regina Oliveira  
Coordenadora do CEP / HSR

**Dra. Regina Oliveira**  
Coordenadora do CEP  
Monte Tabor/ HSR