



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FARMACOLOGIA

RENAN MAGALHÃES MONTENEGRO

**Estudo da associação entre a acromegalia e a presença da
mutação BRAF^{V600E} e a expressão imunohistoquímica de IGF-1 e
galectina-3 no carcinoma papilífero de tireoide**

FORTALEZA
2012

RENAN MAGALHÃES MONTENEGRO

**Estudo da associação entre a acromegalia e a presença da
mutação BRAF^{V600E} e a expressão imunohistoquímica de IGF-1 e
galectina-3 no carcinoma papilífero de tireoide**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

**FORTALEZA
2012**

A ficha catalográfica está pronta e esta será substituída.

Montenegro, Renan Magalhães

Título/ Renan Magalhães Montenegro. – Fortaleza, 2012.

f.

Orientador: Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, CE.

1. Acromegalia 2. Carcinoma Papilífero de Tireoide 3. Mutação BRAF^{V600E}. I. (orient.) II. Título.

RENAN MAGALHÃES MONTENEGRO**Estudo da associação entre a acromegalia e a presença da mutação BRAF^{V600E} e a expressão imunohistoquímica de IGF-1 e galectina-3 no carcinoma papilífero de tireoide**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em 31/08/2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes
Orientadora / Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Edna Teruko Kimura
Co-orientadora / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Lucio Vilar
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thomaz Rodrigues Porto da Cruz
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale
Universidade Federal do Ceará

*À minha esposa Vera, responsável maior pela educação
e conduta moral e ética de nossos três maravilhosos filhos:
Renan Junior, Ricardo e Alexandre.*

*Aos queridos netos Mariana, Ana Luiza, Amanda e Alexandre Junior,
meu grande afeto, carinho e alegria de viver.*

À minha nora Ana Paula a gratidão, o respeito e a admiração.

A minha nora Ivonete o afeto e o carinho.

*Ao meu querido irmão Ademar, a falta e imensa
saudade que deixou ao partir tão cedo desta vida.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, orientadora desta tese, pelo apoio e incentivo.

À Prof. Dra. Edna Kimura, co-orientadora, que de bom grado, concordou em realizar o estudo genético e imuno-histoquímico desta pesquisa, sempre pronta a atender e dirimir minhas dúvidas,

À Prof. Dra. Leticia Veras Lotufo, coordenadora da pós-graduação em Farmacologia, por sua prestabilidade e atenção.

Às queridas Clarisse e Helane, consideradas como verdadeiras filhas, pelo carinho, dedicação e inestimável ajuda na elaboração desta tese.

Ao Renan Junior, inspirador maior deste trabalho, pelo apoio, ideias e sugestões durante todo o desenvolvimento do projeto.

À querida Mônica Albano, pela dedicação e atendimento aos pacientes acromegálicos.

Às amigas Virgínia Fernandes, Ana Paula Abreu e Ana Rosa Quidute, meu afeto.

Às dras. Tereza Neuma e Luciana Rocha, responsáveis pelos laudos histo-patológicos.

Ao Prof. Dr. Vagnaldo Fachine, pela contribuição na análise estatística.

Aos colegas cirurgiões de cabeça e pescoço: Drs. Monteiro, Albano, Marcelo Esmeraldo, André Cortez e Pedro Colares que disponibilizaram os casos.

Ao Prof. Dr. Carlos Clayton Aguiar pela amizade, atenção e apoio psicológico.

Às ex-residentes Patrícia Figueiredo e Renée Cintra pela ajuda no atendimento e compilação dos dados clínicos.

Ao Dr. Cesar Fuziwara, pela contribuição no envio de figuras do estudo.

Ao estudante da liga de Neuro-Endócrino Pedro Sabino pelo auxílio na digitação da bibliografia.

Às secretárias Aura Rhanes e Márcia Borges pelo carinho e atenção.

Aos Prof. Drs. Otoni Cardoso do Vale, Lucio Vilar e Thomaz Cruz, que, de bom grado, aceitaram participar de minha banca de doutorado.

Aos Drs. Catarina Dalva, Karina Sodré e Manoel Martins, pela importante contribuição durante o processo de qualificação desta tese.

Aos pacientes que cederam o material de estudo, pelo incentivo científico na busca de melhorias desta enfermidade.

À Universidade Federal do Ceará, Hospital Universitário Walter Cantídio e Serviço de Endocrinologia e Diabetes, aos quais dediquei minha vida acadêmica.

Uma pessoa permanece jovem na medida em que ainda é capaz de aprender, adquirir novos hábitos e tolerar contradições.

Marie Von Ebner Eschembach

Feliz quem atravessa a vida tendo mil razões para viver.

Padre Jan Gerard Ter Reegan

RESUMO

Palavras-chave: acromegalia, carcinoma papilífero de tireoide, BRAF^{V600E}, imunohistoquímica, IGF-1, galectina-3.

INTRODUÇÃO: Estudos epidemiológicos sugerem que o carcinoma de tireoide seja a neoplasia maligna mais frequente nos pacientes acromegálicos. Até este momento não há relatos de estudos avaliando marcadores moleculares do carcinoma papilífero de tireoide (CPT) nessa população. **OBJETIVOS:** Avaliar a associação entre acromegalia, presença da mutação BRAF^{V600E}, marcadores imunohistoquímicos (galectina-3 e IGF-1) e características clínico-patológicas em pacientes acromegálicos com CPT. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo transversal realizado no período de janeiro/09 a dezembro/2011, onde 11 pacientes acromegálicos com CPT, provenientes de 5 centros brasileiros de referência no tratamento da acromegalia foram comparados com 45 pacientes com CPT sem acromegalia. Foram estudadas variáveis clínicas e histopatológicas do CPT. Utilizou-se cortes histológicos de CPT emblocados em parafina para o estudo da mutação BRAF^{V600E} e para a análise imunohistoquímica dos marcadores IGF-1 e galectina-3. Na análise utilizou-se os testes t de student e do qui-quadrado (*software* SPSS, versão 13.0 para *Windows*) ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** A idade média dos pacientes acromegálicos com CPT foi de $61,5 \pm 6,02$ anos, sendo 72,7% do sexo feminino. O tempo médio de diagnóstico da acromegalia foi de $7,7 \pm 3,90$ anos, sendo o intervalo entre o diagnóstico da acromegalia e do CPT, em média, $3,4 \pm 2,71$ anos. Os níveis séricos de IGF-1 dos acromegálicos ao diagnóstico do CPT foi de 417,0 ng/mL. Não houve diferença quanto ao estadiamento TNM (*Tumor, Nodule, Metastasis*) e índice prognóstico AMES (*Ages, Metastasis, Extent, Size*) entre os grupos. Houve maior prevalência da mutação BRAF^{V600E} (90,9% vs 55,6%; $p = 0,039$) e de forte imunoexpressão para IGF-1 (88,9% vs 38,1%; $p = 0,017$) nos acromegálicos. Não houve diferença na expressão de galectina-3 entre os grupos. **CONCLUSÃO:** Neste trabalho, pela primeira vez se mostrou uma alta prevalência da mutação BRAF^{V600E} em CPT de acromegálicos, muito superior à descrita na população com CPT neste e em estudos anteriores (cerca de 40%). Contudo essa mutação não se mostrou associada a um fenótipo mais agressivo do tumor, o que diverge dos achados em população não acromegálica com CPT. Conclui-se que a acromegalia é possivelmente associada à mutação BRAF^{V600E} em pacientes acromegálicos com CPT. Novos estudos serão necessários para definir os mecanismos responsáveis por tal associação.

ABSTRACT

Keywords: acromegaly, papillary thyroid carcinoma, BRAFV^{600E}, imuohistoquímica, IGF-1, galectin-3.

INTRODUCTION: Epidemiological studies suggest that thyroid carcinoma is the most common malignant neoplasm in acromegalic patients. At this moment there are no reports of studies evaluating molecular markers of papillary thyroid carcinoma (PTC) in this population. **OBJECTIVES:** The present work aimed to evaluate the association between acromegaly, expression of the mutation BRAF^{V600E}, immunohistochemical markers (galectin-3 and IGF-1), and clinical-pathological characteristics in acromegalic patients with PTC. **MATERIALS AND METHODS:** This is a cross-sectional study conducted from January/09 to December/2011, where 11 acromegalic patients with CPT, from 5 Brazilian centers of reference in the treatment of acromegaly were compared with 45 patients with acromegaly without PTC. We evaluated clinical and histopathological variables of PTC. We used histological PTC embedded in paraffin for mutation study BRAFV600E and immunohistochemical analysis of markers IGF-1 and galectin-3. In the analysis we used the Student t test and chi-square test (SPSS software, version 13.0 for Windows) ($p < 0.05$). **RESULTS:** The average age of acromegalic patients with PTC was 61.5 ± 6.02 years and 72.7% were female. The average time of diagnosis of acromegaly was 7.7 ± 3.90 years, and the interval between diagnosis of acromegaly and PTC was an average 3.4 ± 2.71 years. The serum levels of IGF-1 in the diagnosis of acromegaly PTC was 417.0 ng / mL. There was no difference in the TNM (Tumor, Nodule, Metastasis) and AMES prognostic index (Ages, Metastasis, Extent, Size) between groups. There was a higher prevalence of the BRAF^{V600E} mutation (90.9% vs 55.6%, $p = 0.039$) and stronger immunohistochemical expression for IGF-1 (88.9% vs 38.1%, $p = 0.017$) in acromegaly. There was no difference in the expression of galectin-3 between the groups. **CONCLUSION:** This work for the first time showed a high prevalence of mutations in BRAFV600E in PTC of acromegalic patients superior to those described in the population with PTC in this and previous studies (approximately 40%). However, this mutation was not associated with a more aggressive tumor phenotype, which differs from the findings in acromegalic population without PTC. We conclude that acromegaly is possibly associated to a mutation BRAFV600E in acromegalic patients with CPT. Further studies are needed to define the mechanisms responsible for this association.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	Classificação histológica do Carcinoma de Tireoide	20
QUADRO 2	Sistema TNM para Carcinoma de Tireoide	22
QUADRO 3	Estadiamento TNM para Carcinoma de Tireoide	23
QUADRO 4	Índice Prognóstico de AMES	23
FIGURA 1	Ilustração esquemática da via MAPK	29
FIGURA 2	Eletroferograma representativo do sequenciamento do exon 15 do gene <i>BRAF</i> a partir de DNA genômico extraído de blocos de parafina de tecido com diagnóstico de carcinoma papilífero de tireoide (CPT)	42
FIGURA 3	Eletroforese para análise da mutação <i>BRAF</i> ^{T1799A} pela técnica de SSPC em tecido de CPT.	48
FIGURA 4	Expressão imunohistoquímica de IGF-1 e galectina-3 em tecido tireoidiano.	55
GRÁFICO 1	Correlação linear entre tamanho tumoral e expressão IHQ de IGF-1 entre os pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=30).	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Características clínico-patológicas relacionadas ao carcinoma papilífero de tireoide do grupo de pacientes com acromegalia. (n= 11). Fortaleza – CE, 2012.	45
TABELA 2	Características relacionadas ao diagnóstico e tratamento da acromegalia (n = 11). Fortaleza – CE, 2012.	46
TABELA 3	Características clínico-patológicas relacionadas ao carcinoma papilífero de tireoide do grupo de pacientes com CPT sem acromegalia (n = 45). Fortaleza – CE, 2012.	47
TABELA 4	Prevalência da presença da mutação BRAF ^{V600E} e dos marcadores imunohistoquímicos IGF-1 e galectina-3 nos grupos com acromegalia e CPT <i>versus</i> CPT (n=56). Fortaleza – CE, 2012.	49
TABELA 5	Análise de associação entre variáveis clínico-epidemiológicas e imunohistoquímicas e presença da mutação BRAF ^{V600E} em pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=56). Fortaleza – CE, 2012.	50
TABELA 6	Análise de regressão logística multivariada para a presença da mutação BRAF ^{V600E} em pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=54). Fortaleza – CE, 2012.	51
TABELA 7	Análise de associação entre variáveis clínico-epidemiológicas e imunohistoquímicas e imunoexpressão para IGF-1 em pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=30). Fortaleza – CE, 2012.	52
TABELA 8	Análise de associação entre variáveis clínico-epidemiológicas e imunohistoquímicas e imunoexpressão para galectina-3 em pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=32). Fortaleza – CE, 2012.	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMES	<i>Age Metastasis Extent Size</i>
CPT	Carcinoma Papilífero de Tireoide
CK	Citoqueratina
DP	Desvio-padrão
GH	<i>Growth Hormone</i>
GHRH	<i>Growth Hormone Releasing Hormone</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IGF-2	<i>Insulin-like Growth Factor-2</i>
IGFBPs	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
MEK	<i>Mitogenic Extracellular kinase</i>
PCR-RLFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reation</i>
SED-UFC	Serviço de Endocrinologia e Diabetes – Universidade Federal do Ceará
SSCP	<i>Single-strand conformation polymorphism</i>
Tg	Tireoglobulina
TNM	<i>Tumor Nodule Metastasis</i>
TSH	<i>Thyroid Stimulator Hormone</i>
TTF-1	<i>Thyroid Transcription Factor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Acromegalia	15
1.2	Papel do GH e IGF-1 na patogênese da proliferação celular e desenvolvimento de neoplasias	17
1.3	Associação entre acromegalia, IGF-1 e Doenças Proliferativas da Tireoide	19
1.4	Carcinoma de Tireoide	19
1.5	Carcinoma Papilífero de Tireoide (CPT)	24
1.5.1	Apresentação clínica e diagnóstico do CPT	24
1.5.2	Patologia do CPT	26
1.5.3	Galectina-3	27
1.5.	Patogênese Molecular: via MAPK/ERK quinase	28
4		
1.6	Papel da mutação BRAF^{V600E} no CPT	30
1.6.	Associação entre mutação BRAF ^{V600E} e características clínico-patológicas de alto risco no CPT	31
1		
1.6.	Associação entre mutação BRAF ^{V600E} e recorrência do CPT	33
2		
1.6.	Associação entre mutação BRAF ^{V600E} e perda de avidéz ao radioiodo	34
3		
1.6.	Bases Moleculares para maior grau de invasão e progressão do CPT associado à mutação BRAF ^{V600E}	35
4		
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo Geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	MÉTODOS	39
4.1	Tipo de estudo, local e casuística (população e amostra)	39
4.2	Diagnóstico de Acromegalia e de Carcinoma Papilífero de Tireoide	39
4.3	Critérios de exclusão	40
4.4	Variáveis do estudo	40
4.4.1	Análise da mutação genômica BRAF ^{V600E}	41
4.4.2	Ensaio Imuno-histoquímico (IHQ)	42
4.5	Análise estatística	43
4.6	Aspectos éticos	43
4.7	Conflitos de interesse	44
5	RESULTADOS	45
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acromegalia

Em 1886 Pierre Marie publicou a primeira descrição clínica de alteração do crescimento somático e de proporções corpóreas e propôs o nome “acromegalia”. Evans e Long induziram gigantismo em ratos, injetando extratos de hipófise anterior, confirmando a associação entre um fator hipofisário e crescimento somático (MELMED, 2008).

Subsequentemente reconheceu-se que a doença está associada com um adenoma hipofisário secretor de hormônio de crescimento (GH), do que resultam distúrbios decorrentes da lesão central e efeitos periféricos pela exposição prolongada aos altos níveis do GH (MELMED, 2010).

A acromegalia é uma doença crônica, desfigurante e debilitante, que reduz a expectativa de vida dos pacientes acometidos. O excesso de GH leva a um aumento da produção do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1) em diversos tecidos. Acomete indivíduos de qualquer faixa etária, sendo mais comum entre os 30 e 50 anos de idade, atingindo igualmente homens e mulheres. A sua prevalência não é conhecida, mas dados de estudos europeus revelam uma estimativa de 40 a 70 casos por milhão de habitantes; e 3 a 4 novos casos por milhão de habitantes por ano, o que corresponde a cerca de 650 novos casos por ano no Brasil (MELMED, 2009)

A principal causa de acromegalia (mais de 90% dos casos) é o adenoma hipofisário secretor de GH. Mais de 70% destes tumores são macroadenomas (tumores maiores que 1 cm). Os adenomas somatotróficos crescem lentamente e a maioria dos pacientes tem mais de 50 anos na ocasião do diagnóstico. Raramente, a acromegalia pode ser decorrente de secreção anormal do hormônio liberador de GH (GHRH) por tumores hipotalâmicos ou extracranianos (MELMED, 2008).

As principais manifestações decorrentes do excesso de GH são alterações crânio-faciais (alargamento da mandíbula, separação dos dentes, prognatismo, fronte proeminente e crescimento dos lábios e nariz), aumento das extremidades, resistência à insulina, intolerância à glicose, diabetes melito, hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, hipertrofia de ventrículo esquerdo, arritmias, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, hipertrofia da mucosa e das cartilagens da laringe, macroglossia, pneumomegalia, estreitamento das vias aéreas, apneia do sono central ou obstrutiva,

irregularidade menstrual, infertilidade, disfunção erétil, artralguas, artropatia degenerativa de joelhos, ombros, quadril e coluna lombar, síndrome do túnel do carpo, aumento do coxim calcâneo, visceromegalias, pólipos intestinais e outras neoplasias benignas e malignas (MELMED, 2008).

Além dos sintomas relacionados às ações periféricas do GH e IGF-1, podem ocorrer manifestações decorrentes do comprometimento central pelos efeitos de massa do macroadenoma: cefaleia grave e debilitante, compressão do quiasma levando a defeitos do campo visual, sendo mais comum a hemianopsia bitemporal (MELMED, 2008).

O diagnóstico é realizado através das dosagens plasmáticas de GH e IGF-1. Valores de GH basal $> 0,4$ ng/mL e/ou IGF-1 elevado para sexo e idade indicam rastreamento positivo para a doença. O diagnóstico é confirmado, em não diabéticos, pela ausência de supressão do GH para $< 1,0$ ng/mL no teste de tolerância com 75g de glicose e em diabéticos pelo GH médio (5 medidas a cada 30 min) $> 2,5$ ng/mL (MELMED, 2010).

Por se tratar de uma doença rara e de curso clínico insidioso, o diagnóstico é realizado tardiamente, em geral após 10 anos de evolução, culminando em redução da qualidade e da expectativa de vida dos indivíduos. A taxa de mortalidade é 2 a 4 vezes maior do que a da população geral, ocorrendo em 60% dos casos por complicações cardiorrespiratórias, 25% por doenças respiratórias e 15% por neoplasias (MELMED, 2008).

O tratamento visa eliminar o adenoma hipofisário, suprimir a hipersecreção de GH e IGF-1 e manter normal a função da hipófise anterior. Os efeitos da massa tumoral devem ser aliviados, principalmente a compressão do trato visual. Os níveis de GH e IGF-1 devem ser normalizados, posto que níveis elevados de GH estão associados com aumento de mortalidade. A integridade da função hipofisária deve ser preservada e, se o hipopituitarismo se desenvolver, a reposição permanente dos hormônios hipofisários precisa ser instituída (MELMED, 2008).

Várias opções terapêuticas são preconizadas para a acromegalia: ressecção cirúrgica transesfenoidal, tratamento medicamentoso com análogos da somatostatina, agonistas dopaminérgicos e antagonistas do receptor do GH, além da radioterapia (MELMED, 2010).

A cirurgia transesfenoidal é a 1ª opção terapêutica e o principal determinante de sucesso é a experiência do neurocirurgião. Ela rapidamente alivia os sintomas, remove a

massa tumoral, descomprime o quiasma óptico e alivia a cefaleia. Complicações pós-operatórias podem ocorrer em até 10% dos pacientes e incluem: diabetes insípido permanente, fístula liquórica, meningite e hipopituitarismo. Entretanto, como mais de 70% dos tumores é macroadenomas, a maioria dos pacientes não consegue um controle bioquímico satisfatório (GH basal $\leq 2,5$ mcg/L e IGF-1 normal para o sexo e a idade), necessitando de outras opções de tratamento (VIEIRA NETO *et al.*, 2011).

No que se refere à terapêutica medicamentosa destacam-se: 1) Análogos da somatostatina: Octreotide – é um análogo octapeptídico da somatostatina nativa, que se liga seletivamente ao subtipo de receptor SSTR2 da somatostatina. A droga inibe a secreção hipofisária de GH, suprime a produção hepática de IGF-1, controla o crescimento tumoral e alivia os sintomas em mais de 50% dos pacientes; 2) Agonistas dopaminérgicos: Doses elevadas de agonistas dopaminérgicos, isoladas ou associadas aos análogos da somatostatina, têm sido preconizadas como opção terapêutica. A droga utilizada atualmente é a cabergolina, que normaliza os níveis de GH em mais de um terço dos casos. As melhores respostas mostram-se nos pacientes que têm, concomitantemente, elevação de prolactina e GH basal não muito elevado; 3) Antagonistas do receptor do GH: Pegvisoman – inibe diretamente a ação do GH na periferia, suprimindo a geração periférica de IGF-1 em mais de 90% dos acromegálicos. Não tem ação sobre a secreção de GH pelo adenoma hipofisário, de modo que o GH mantém-se elevado. Dest’arte, o controle bioquímico do tratamento é realizado pela dosagem de IGF-1 sérico. 4) Radioterapia: A radioterapia hipofisária convencional pode ser realizada por radiação externa, com uma fonte de cobalto 60 ou cíclotron, administrada em dose total de 4.500 a 5.000 rad, fracionada em um período de 6 semanas. Mais recentemente, passou-se a empregar a ablação estereotáxica do tumor hipofisário, com irradiação tumoral mais efetiva e menos danosa aos tecidos circunvizinhos. A radiocirurgia *gama knife* é uma nova técnica promissora, bem como a terapia com *proto-bean*, ainda não disponíveis na maioria dos centros. Com o emprego da radioterapia a diminuição do GH é lenta, em média 20% ao ano (MELMED, 2010).

1.2 Papel do GH e IGF-1 na patogênese da proliferação celular e desenvolvimento de neoplasias

A relação entre excesso de GH e câncer foi suspeitada há cinco décadas após a realização de estudos em ratos hipofisectomizados submetidos à reposição de GH. O

tratamento com altas doses deste hormônio induziu o surgimento de neoplasias nestes modelos experimentais (CLAYTON *et al.*, 2011). Em meados da década de 80, apareceram relatos sugerindo que pacientes com acromegalia poderiam apresentar aumento de mortalidade por câncer, notadamente câncer colorretal (RENEHAN; O'DWYER; SHALET, 2000). Adicionalmente, estudos populacionais mostram aumento discreto de risco de câncer em pessoas com níveis de IGF-1 no limite superior da normalidade, quando comparados aqueles cujos valores se encontram no limite inferior da normalidade (FUCHS *et al.*, 2008).

A maior parte das neoplasias malignas deriva de células epiteliais, e expressam genes codificadores do receptor de insulina e do receptor de IGF-1. Isto leva a uma situação onde não apenas receptores de insulina e IGF-1, mas também receptores híbridos encontram-se expressos na superfície celular. Estes se ligam à insulina, IGF-1 e IGF-2 (PANDINI *et al.*, 2007). O receptor de IGF-2 não sofre tradução, mas serve como limitador de crescimento ao competir com o receptor de IGF-1 (FUCHS *et al.*, 2008).

Quantidades substanciais de IGF-1 e IGF-2 são localmente produzidas pelo tecido neoplásico de maneira autócrina ou parácrina, e isto provê uma fonte destes ligantes suplementar à produção endócrina. Também presentes no líquido extracelular, encontram-se as proteínas ligadoras de IGF (IGFBP) e suas proteases, que regulam a biodisponibilidade de IGF-1 e IGF-2 (FIRTH *et al.*, 2002; FUCHS *et al.* 2008).

Em nível celular, a sinalização do IGF-1 ativa seu receptor com atividade quinase, levando a sua fosforilação assim como de outros substratos, incluindo as proteínas IRS (*Insulin Receptor Substrate*) e Shc. Através destas reações de fosforilação, a sinalização do IGF-1 é traduzida em um complexo sistema de quinases serina/treonina e lípidos intracelulares, que são responsáveis pela sua atividade mitogênica e antiapoptótica (LAVIOLA; NATALICCHIO; GIORGINO, 2007). Promove ainda, um aumento de angiogênese, linfangiogênese e da motilidade celular. Adicionalmente, desempenha um papel na regulação da diferenciação celular e do seu citoesqueleto, potencializando os efeitos de outros fatores de crescimento (RENEHAN, A.; O'DWYER, S.; SHALET, S. 2000).

Finalmente, a influência do hiperinsulinismo do hospedeiro no comportamento do câncer tem sido testada em experimentos recentes, evidenciando que a expressão de receptores de insulina, assim como de receptores híbridos, são importantes mediadores de proliferação e proteção contra apoptose (PANDINI *et al.*, 2007); além disso, é possível que possa promover indiretamente carcinogênese, através da redução hepática

de IGFBP-1 e possivelmente IGFBP-2, resultando em aumento dos níveis circulantes de IGF-1 livre e bioativo (SUIKKARI, 1998; BONI-SCHNETZLER, 1990; GIOVANNUCCI, 1995 *apud* CLAYTON *et al.*, 2011). Estes achados podem ter implicações importantes, tanto para a prevenção quanto para o tratamento de neoplasias comuns, através de mudanças de estilo de vida e/ou medidas farmacológicas para evitar risco aumentado de câncer (PANDINI *et al.*, 2007).

1.3 Associação entre Acromegalia, IGF-1 e Doenças Proliferativas da Tireoide

A prevalência de bócio entre acromegálicos é aumentada, variando de 11% a 92% em diferentes séries, a depender do método empregado, se palpação ou ultrassonografia (LOEPER; EZZAT, 2007). Para exemplificar, em 2002 foi realizado um estudo multicêntrico italiano onde foram analisados 258 pacientes com acromegalia, dos quais 78% apresentavam alguma alteração tireoidiana, particularmente bócio nodular atóxico (GASPERI *et al.*, 2002). Resultado semelhante foi encontrado por Tita *et al.* (2005), cuja prevalência de bócio difuso e nodular totalizou 82%. Em concordância com estes estudos, série de 124 pacientes com acromegalia diagnosticados no Nordeste do Brasil apresentou prevalência de alteração tireoidiana em torno de 74%, incluindo principalmente bócio nodular (54,0%) e difuso (20,2%) (DOS SANTOS *et al.*, 2012)

Em relação ao câncer de tireoide, estudos epidemiológicos relataram um aumento do risco deste câncer em acromegálicos quando comparados à população geral (ORME *et al.*, 1998; BARIS *et al.*, 2002). Ainda no estudo de Gasperi *et al.* (2002) foram encontrados 3 casos de carcinoma papilífero (1,2%); prevalência esta discretamente aumentada em relação à população geral. Baris *et al.* (2002) reforçaram estes achados ao estudar 1634 pacientes com acromegalia, evidenciando um aumento de 3,7 vezes no risco de neoplasia de tireoide neste grupo (IC95% 1,8-10,9).

1.4 Carcinoma de tireoide

O carcinoma de tireoide é o mais prevalente dos tumores malignos do sistema endócrino e compreende as neoplasias originárias da célula folicular ou da célula parafolicular, acometendo aproximadamente 5% dos nódulos da tireoide. A incidência de câncer de tireoide, principalmente de carcinomas diferenciados, vem aumentando

progressivamente nos últimos anos em todo o mundo. Nos Estados Unidos, o aumento na incidência é o mais rápido entre os tipos de câncer humanos comuns, com uma incidência atual de 33.550 casos por ano e uma prevalência de 366.466 casos (SCHLUMBERGER, 2008).

Os principais subtipos histológicos são o carcinoma papilífero de tireoide (CPT), o carcinoma folicular e o carcinoma anaplásico. O CPT é o subtipo mais comum, respondendo por mais de 80% de todas as neoplasias malignas desta glândula. O aumento da incidência de câncer de tireoide é quase inteiramente atribuído ao diagnóstico aumentado do CPT, especialmente das pequenas lesões de CPT (SCHLUMBERGER, 2008).

As lesões neoplásicas da tireoide podem ser subdivididas de acordo com a sua classificação histológica, conforme demonstrado no quadro 1.

Tumores primários epiteliais	Benignos
	Adenoma folicular
	Malignos
	Carcinoma papilífero Carcinoma folicular Carcinoma indiferenciado (anaplásico)
Tumores de células C	Carcinoma medular
Tumores mistos de células foliculares e células C	Carcinoma medular-folicular
Tumores primários não-epiteliais	Linfomas malignos Sarcomas
Tumores secundários metastáticos	

Quadro 1 – Classificação histológica do Carcinoma de Tireoide.

Fonte: Williams Textbook of Endocrinology. 11.ed..

O carcinoma diferenciado da tireoide, incluindo o CPT, é relativamente indolente e altamente curável. No entanto, uma taxa de recorrência significativa, cerca de 20% em 10 anos e 30% em 30 anos de seguimento, é observada após o tratamento inicial. O impacto psicossocial e econômico da reincidência pode ser significativo e a qualidade de vida dos pacientes com carcinoma de tireoide recorrente pode ser comprometida. Apesar do carcinoma de tireoide apresentar uma baixa taxa de mortalidade com o tratamento cirúrgico em conjunto com a terapia de ablação com radioiodo, abordagem altamente curativa para a maioria dos pacientes, algumas pessoas

ainda morrem por esta condição. A taxa atual de mortalidade nos Estados Unidos é de 1.530 casos por ano. Os pacientes apresentam maiores taxas de mortalidade quando o carcinoma torna-se cirurgicamente inoperável e quando perde a avidéz por radioiodo. Não há atualmente tratamento curativo para este grupo. O manejo adequado dos pacientes, baseado em estratificação de risco e avaliação prognóstica, é importante para reduzir a taxa de recorrência, bem como a morbidade e mortalidade por carcinoma de tireoide (SCHLUMBERGER, 2008).

O estadiamento das lesões tireoidianas é realizado de acordo com o sistema TNM, que utiliza três componentes principais: (1) extensão do tumor primário (T), (2) ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais (N), e (3) ausência ou presença de metástases a distância (M). Além destes critérios, para o estadiamento das lesões diferenciadas da tireoide, carcinoma papilífero e folicular, são utilizados a idade e o subtipo histológico, devido à importância destes elementos na predição do comportamento e prognóstico do câncer de tireoide. O sistema TNM e o estadiamento estão descritos nos quadros 2 e 3 (SCHLUMBERGER, 2008).

Além do estadiamento TNM, destaca-se o emprego do Índice Prognóstico AMES, que foi criado em 1998 por Candy e Rossi, na Clínica Lahey. Tem como fundamento a análise multifatorial dos fatores prognósticos do câncer de tireoide. Seu nome deriva das iniciais, na língua inglesa, dos quatro fatores avaliados: idade (*Age*), presença de metástase a distância (*Metastasis*), extravasamento capsular (*Extent*) e tamanho do tumor primário (*Size*). Os pacientes são divididos em dois grupos, de acordo com o risco de mortalidade: alto e baixo risco. (Quadro 4)

Tumor primário (T)	T0	Não há evidência de tumor primário
	Tx	Nenhuma evidência de tumor primário
	T1	a) Tumor \leq 1 centímetro limitado à tireoide b) Tumor de 1 a 2 centímetros limitado à tireoide
	T2	Tumor $>$ 2 a \leq 4 centímetros limitado à tireoide
	T3	Tumor $>$ 4 cm limitado à tireoide ou qualquer tumor com extensão extratireoideana mínima
	T4 (qualquer tamanho que ultrapasse a cápsula tireoidea)	a) Tumor de qualquer tamanho com extensão além da cápsula da tireoide e que invade qualquer das seguintes estruturas: tecido celular subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago, nervo laríngeo recorrente b) Tumor que invade fáscia pré-vertebral, vasos mediastinais ou artéria carótida
Linfáticos regionais (N)	N0	Sem metástases em linfonodos regionais
	Nx	Indeterminado (não avaliado)
	N1 Metástase em linfonodos regionais	a) metástases em linfonodos pré-traqueais e paratraqueais, incluindo linfonodos pré-laríngeos b) metástases em outros linfonodos cervicais unilaterais, bilaterais ou contralaterais ou linfonodos mediastinais superiores
Metástases (M)	M0	Ausência de metástases a distância
	M1	Metástase à distância

Quadro 2 – Sistema TNM para Carcinoma de Tireoide.

Idade <45 anos	Estágio I	Qualquer T, qualquer N, M0
	Estágio II	Qualquer T, qualquer N, M1

	Estágio III	Nenhum
	Estágio IV	Nenhum
Idade >45 anos	Estágio I	Nenhum
	Estágio II	T2, N0, M0
	Estágio III	T3, N0, M0 T1-3, N1a, M0
	Estágio IV	IVA: T1-3, N1b, M0 T4a, qualquer N, M0; IVB: T4b, qualquer N, M0 IVC: qualquer T, qualquer N, M1

Quadro 3 – Estadiamento TNM para Carcinoma de Tireoide

Fonte: De Beahrs OH, Henson DE, RVP Hutter *et al.* Manual para o estadiamento do câncer. Philadelphia JB Lippincott, 1992. Comissão Mista Americana de Câncer. Tireoide. No Manual do AJCC Cancer Staging, 6^a ed. New York: Springer, 2002:89-98. * Para classificar como N0, pelo menos seis linfonodos devem ser examinados à histologia. Caso contrário, a doença é classificada como Nx.

Baixo risco	Alto risco
Sexo masculino < 41 anos e sexo feminino < 51 anos sem metástases à distância;	Sexo masculino ou feminino, qualquer idade, com metástases à distância;
Sexo masculino ≥ 41 anos ou sexo feminino ≥ 51 anos com:	Sexo masculino ≥ 41 anos ou sexo feminino ≥ 51 anos com:
Carcinoma papilífero intratireoidiano ou carcinoma folicular minimamente invasivo e tumor primário menor do que 5,0 cm e ausência de metástases à distância	Carcinoma papilífero com extensão extratireoidiana ou carcinoma folicular extensamente invasivo e/ou tumor primário maior ou igual a 5,0 cm

Quadro 4: Índice prognóstico AMES.

Fonte: Candy B, Rossi R. Na expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. Surgery. 1988; 104:947-53. AMES (*age of the patient, metastases of the tumor, extent of primary tumor, size of the tumor*)

1.5 Carcinoma Papilífero de Tireoide (CPT)

O CPT é definido como um tumor epitelial maligno que apresenta evidências de diferenciação das células foliculares, caracterizado pela formação de papilas e/ou um

conjunto de alterações nucleares típicas. Microcarcinoma papilífero da tireoide é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um CPT $\leq 1,0$ cm de diâmetro (SCHLUMBERGER, 2008).

O CPT é a neoplasia maligna mais comum desta glândula, correspondendo a 50% a 90% dos casos de carcinomas diferenciados da tireoide em todo o mundo (HAY, 1990). Vem sendo observado aumento da incidência do CPT nos últimos anos, em diversos países, especialmente do microcarcinoma papilífero. Nos Estados Unidos, ocorreram 10.000 casos em 1980, mas cerca de 22.000 casos foram estimados em 2004. Apesar deste aumento de incidência, a taxa de mortalidade está declinando (COLONNA *et al.*, 2002).

Embora o CPT possa acometer indivíduos de qualquer idade, a maioria dos casos ocorre em pacientes entre 30 e 50 anos (idade média de 45 anos). As mulheres são afetadas com maior frequência (60% a 80%), com uma razão feminino / masculino de 4:1 (COLONNA, *et al.*, 2002).

1.5.1 Apresentação clínica e diagnóstico do CPT

O CPT usualmente se apresenta como um nódulo tireoidiano (frio à cintilografia da tireoide) ou como linfadenopatia cervical. Em áreas com suficiência de iodo, o CPT usualmente se manifesta como um nódulo palpável solitário em uma glândula tireoidiana relativamente normal. Estudos diagnósticos realizados para outros fins, como ultrassonografia cervical, tomografia computadorizada e ressonância magnética, têm revelado numerosos nódulos tireoidianos incidentais não-palpáveis. Estes nódulos impalpáveis, que podem se revelar malignos, correspondem aos pequenos focos de CPT encontrados como achado incidental em peças de tireoidectomias ou autópsias. O significado clínico destes nódulos impalpáveis é insignificante, tendo em vista que provavelmente não alteram a sobrevida normal dos pacientes (SCHLUMBERGER, 2008).

Ao diagnóstico, a maioria das lesões de CPT mede de 1 a 4 cm de tamanho. A neoplasia frequentemente é multifocal, podendo ser bilateral em 20% a 80% dos casos, dependendo da série. Estudos recentes têm sugerido que a lesão de CPT contralateral pode ter uma origem clonal independente (SHATTUCK *et al.*, 2005).

Invasão extratireoidiana dos tecidos moles adjacentes está presente em cerca de 15% dos pacientes à época da primeira cirurgia (variação de 5% a 34%). Como a

disseminação preferencial é por via linfática, cerca de um terço dos pacientes têm linfadenopatia clinicamente evidente na apresentação e aproximadamente 35% a 50% dos linfonodos cervicais excisados têm evidência histológica de envolvimento. Somente 1% a 7% dos pacientes têm metástases a distância no momento do diagnóstico. Os testes de função tireoidiana raramente são alterados em pacientes com CPT (SCHLUMBERGER, 2008).

De uma maneira geral, a sobrevida em 5 anos é excelente, maior que 90%, especialmente entre os pacientes com menos de 45 anos. Somente uma pequena proporção dos pacientes com CPT (cerca de 15%) apresenta recidiva da doença, e uma fração ainda menor (cerca de 5%) têm evolução para mortalidade. Excepcionalmente, pacientes com CPT que têm um curso mais agressivo, tendem a experimentar recidiva precoce. Aumento da idade e presença de invasão extratireoidiana são os principais fatores prognósticos independentes para recidiva da doença em todos os estudos. A presença de metástase a distância e de grande tamanho inicial do tumor primário também são variáveis significativas na maioria dos estudos e alguns grupos relataram que o grau de diferenciação é uma variável independente. A presença de linfadenopatia cervical inicial, embora relevante para a recorrência nodal no futuro, não influencia a mortalidade (SCHLUMBERGER, 2008).

A estratificação de risco para o CPT é realizada atualmente através da avaliação clínica convencional, sendo considerados clássicos fatores de alto risco, a idade do paciente no momento do diagnóstico, sexo masculino, tamanho do tumor, invasão extratireoidiana, metástase para linfonodos e doença avançada. Cada um destes fatores de risco clínico-patológicos tem mostrado ser associado com um aumento de risco para a progressão e recorrência, e até mesmo para aumento da morbimortalidade por câncer de tireoide. Atualmente, a estratificação do risco de acordo com estes critérios clínico-patológicos é considerada primordial na determinação da extensão do tratamento inicial, e do grau de vigilância no acompanhamento do paciente (SCHLUMBERGER, 2008).

1.5.2 Patologia do CPT

O CPT exibe uma variedade de padrões macroscópicos. A maioria das lesões são massas cinza-brancas, com bordos irregulares, mostrando infiltração do

parênquima tireoidiano adjacente. Algumas lesões apresentam calcificações e ocasionalmente podem demonstrar formação de tecido ósseo. O tamanho varia de milímetros a vários centímetros. Muitas vezes podem ser multifocais. Alguns tumores mostram áreas císticas, mas somente raramente, é inteiramente cístico. O CPT pode apresentar extensão direta para a gordura peritireoidiana, músculo esquelético, esôfago, laringe e traqueia (AKSLEN *et al.*, 2000).

As características histopatológicas do CPT incluem a presença de núcleos alargados, de forma oval, alongados e sobrepostos. O nucléolo tipicamente mostra-se claro ou com uma aparência de vidro-fosco. Nos tumores com estruturas papilíferas complexas, o diagnóstico de CPT baseia-se nas características nucleares, que estão presentes na maioria dos casos (SCHLUMBERGER, 2008).

Arquitetura papilífera, quando presente, é tipicamente complexa com borda em escova. Em casos ocasionais, as papilas podem se apresentar edemaciadas. As papilas são cobertas por epitélio com alteração de polaridade e citoplasma pálido ou eosinofílico. Metaplasia escamosa é comum. Outros padrões arquiteturais frequentemente coexistem com as papilas e é incomum encontrar um padrão de crescimento papilífero puro. Estes padrões usualmente incluem folículos de tamanho variado, além de padrões trabeculares e sólidos. Os tumores podem ainda ser císticos. Os corpos psamomatosos são estruturas arredondadas com calcificações laminares concêntricas encontradas em associação com as células tumorais, espaços linfáticos ou estroma tumoral. Esclerose intratumoral e infiltração linfocítica peritumoral são encontradas frequentemente. As papilas devem ser diferenciadas das estruturas papilíferas ocasionalmente encontradas em bócios nodulares ou adenomas foliculares com papilas. O nucléolo destas condições são arredondados, situados lateralmente no citoplasma e não apresentam as características encontradas no CPT (SCHLUMBERGER, 2008).

Existem vários subtipos de CPT com características histológicas específicas. Entre estes subtipos pode-se citar: variante clássica, folicular, macrofolicular, oncocítica, células altas, células claras, esclerosante difusa, células colunares, sólida, cribriforme, insular, mucoepidermóide, células gigantes e carcinoma misto papilar-medular (HAY, 2002).

A maioria dos subtipos apresenta evolução e prognóstico semelhantes, com exceção das variantes células altas e células colunares, que são mais agressivas. Além disso, existe controvérsia em relação à maior agressividade da variante esclerosante

difusa, caracterizada pelo envolvimento difuso de um ou ambos os lóbulos da tireoide, com invasão linfática generalizada, fibrose proeminente e infiltração linfoide (HAY, 2002).

As lesões de CPT são reativas para citoqueratina (CK), tireoglobulina (Tg) e fator de transcrição da tireoide-1 (TTF-1), mas são negativas para cromogranina A e sinaptofisina. Outros marcadores imunohistoquímicos tem sido avaliados para uso no diagnóstico do CPT, entre eles pode-se citar: proteína S100, HLA-DR, receptor de estrógeno, CK de alto peso molecular, CK19 e *RET*. Outros marcadores sugestivos de malignidade em lesões papilíferas incluem HBME-1 e galectina-3. No entanto, estes marcadores não são específicos destes tumores. CK19 tem sido largamente utilizado como marcador para CPT, mas existem relatos de marcação positiva para CK19 na tireoidite linfocítica crônica e em locais de punção aspirativa prévia. O uso de imunohistoquímica para *RET*, a fim de se identificar a expressão do rearranjo RET / PTC, depende da disponibilidade e sensibilidade dos anticorpos (SCHLUMBERGER, 2008).

Tumores metastáticos usualmente exibem perda de p27 e superexpressão de ciclina D1, enquanto CPT não-metastáticos são positivos para p27 e negativos para ciclina D1. Metástases de CPT são positivos para TTF-1 e Tg, enquanto tumores pulmonares primários podem ser positivos para TTF-1 e negativos para Tg. Metástases de CPT em sítios extrapulmonares são negativos para TTF-1 e Tg (SCHLUMBERGER, 2008).

1.5.3. Galectina-3

As galectinas compreendem uma família de proteínas estruturalmente relacionadas e definidas por pelo menos um domínio de reconhecimento de hidrato de carbono com uma afinidade para p-galactosídeos. Até o momento 14 galectinas diferentes foram caracterizadas. Elas são proteínas citosólicas que podem ser translocadas para o núcleo, em vesículas, ou acumular-se em sítios sub-citosólicos (THAN *et al.*, 2008).

Devido ao potencial das galectinas em participar da adesão célula-célula e célula-matriz, regulação do crescimento e processos internos, tais como pré-mRNA *splicing*, é deduzido que esta família de lectinas deve estar envolvida em processos de expressão patológica (HUGHES, 2001). Vários pesquisadores têm relatado a expressão

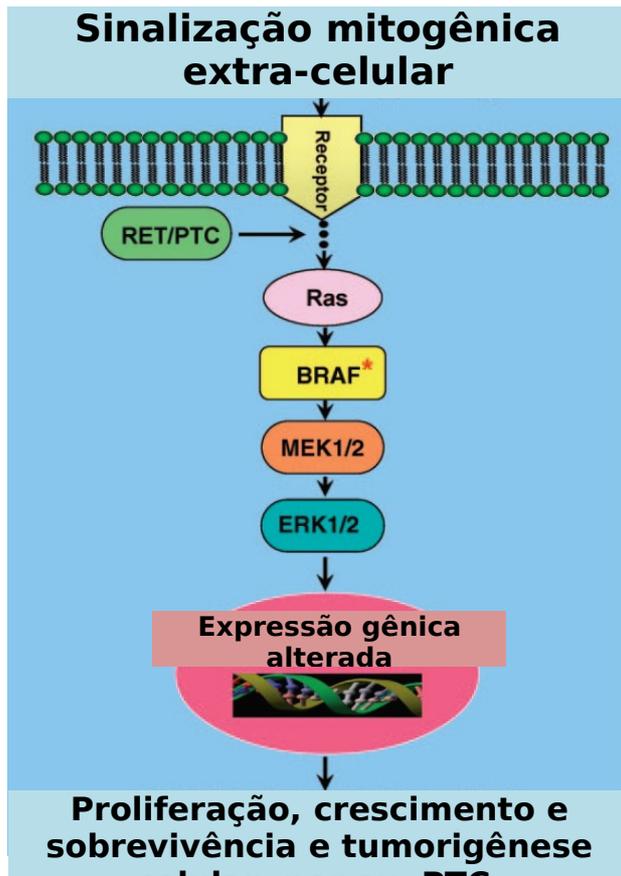
de galectina em tecido tireoidiano humano normal e em tumores da tireoide (CHIARIOTTI *et al.*, 1995). Xu *et al* (1995) examinaram a expressão da galectina-1 e galectina-3 em vários tecidos neoplásicos e não neoplásicos e observaram expressão aumentada de ambas em todos tipos de neoplasias da tireoide de origem epitelial. Altos níveis de galectina-1 e 3 foram encontrados em CPT, mas não em carcinomas foliculares, adenomas foliculares ou em tecido tireoidiano normal (KAWACHI *et al.*, 2000). Foi sugerido que essas diferentes expressões de galectina-3 entre as neoplasias da tireoide estariam relacionadas com diferentes comportamentos biológicos, embora os mecanismos de regulação da galectina-3 não sejam bem compreendidos. Entre várias galectinas, galectina-1, galectina-3 e galectina-7 são de interesse na malignidade tireoidiana (DANGUY *et al.*, 2002).

1.5.4 Patogênese Molecular: via MAPK / ERK quinase

O esforço em melhorar o panorama dos indicadores diagnósticos e prognósticos de carcinomas de tireoide tem focado no uso do perfil molecular e imunohistoquímico para caracterização dos tumores. De maneira geral, as anormalidades estruturais dos cromossomos podem ocorrer em cerca de 50% dos casos de CPT. As alterações genéticas mais comuns envolvem os genes *RET*, *BRAF* e *TRK*, gerando um potente agente mitogênico indutor de transformação maligna, que se alinham na via de sinalização MAP-kinase (SANTORO; MELLILO; FUSCO, 2006).

A via MAPK/ERK quinase (*RET* / *PTC* – *RAS* – *RAF* – *MEK* – *ERK*) é uma clássica via de sinalização intracelular que desempenha um papel fundamental sobre as funções celulares de proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência e, quando aberrantemente ativada, sobre a tumorigênese (MACCORKLE; TAN, 2005; TORII *et al.*, 2004). A ativação fisiológica dessa via é desencadeada por uma grande variedade de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, através de seus receptores na membrana celular. Em células normais, a ativação da RAF-quinase ocorre através da interação direta com um receptor de membrana ligado à proteína G. Uma vez ativada, a RAF-quinase fosforila e ativa a MEK, e esta, por sua vez, fosforila e ativa a ERK. A ERK ativada fosforila moléculas de proteína no núcleo e, finalmente, altera a expressão gênica com conseqüentes mudanças nas atividades biológicas da célula (figura1). A ativação anormal da via MAPK tem sido observada em muitos tipos de câncer humano (SEBOLT-LEOPOLD; HERRERA 2004). Ademais, a via de sinalização MAPK é uma

das principais vias mitogênicas da célula folicular tireoidiana, e respondem a estímulos de diferentes fatores de crescimento ou pela alteração constitutiva do gene *RET*, ativando a cascata RAF – RAS – MEK – ERK. Mutações que afetam esta via são consideradas como o início de eventos moleculares do CPT, encontrando-se ativada em aproximadamente 80% dos CPTs esporádicos ou induzidos por radiação. No entanto, uma parte importante das neoplasias de tireoide não tem um defeito genético identificável (SEBOLT-LEOPOLD; HERRERA 2004).



A sinalização é iniciada no receptor de membrana da célula após estimulação por sinais mitogênicos extracelulares (por exemplo, fatores de crescimento). Após a ativação por ligação com GTP, a proteína interage com a proteína Ras e ativa a proteína Raf quinase. O BRAF ativado fosforila e ativa duas MEKs, MEK1 e MEK2. Estas fosforilam e ativam os dois ERKs que se seguem imediatamente, ERK1 e ERK2. Estas subsequentemente fosforilam as proteínas que se seguem, muitas das quais são quinases, levando a alterações na expressão de vários genes nucleares envolvidos na proliferação celular, crescimento, sobrevivência e tumorigênese. Ressalta-se que a proteína recombinante RET / PTC pode ativar a via MAPK por meio de um passo antes da Ras.

Figura 1. Ilustração esquemática da via MAPK.
Fonte: Adaptado de XING, 2007.

1.6 Papel da mutação BRAF^{V600E} no CPT

O gene *BRAF* é um proto-oncogene localizado no cromossomo 7q34, também denominado *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*. Este gene codifica a B-Raf quinase, uma proteína que pertence à família das proteíno-quinases serina/treonina, que tem como função a regulação da via de sinalização MAPK/ERK. Mutações deste

gene foram identificadas como uma das principais causas de ativação aberrante da via MAPK no câncer humano (DAVIES *et al.*, 2002; MERCER; PRITCHARD, 2003).

Desde 2002, associação entre mutações no gene *BRAF* e neoplasias tem sido descrita, sendo identificadas em 43 linhagens celulares de câncer, incluindo melanoma, câncer colorretal, gliomas, câncer de pulmão, sarcomas, carcinoma de ovário, câncer de mama e hepatocarcinomas. (DAVIES *et al.*, 2002).

Em 2003, Kimura *et al.*, descreveram pela primeira vez na literatura que a mutação *BRAF* é a alteração genética predominante no CPT, presente em 40% dos casos. Estudos subsequentes têm confirmado estes dados. [Namba *et al.* \(2003\)](#) descreveram a mutação *BRAF* no carcinoma de tireoide, determinaram sua ocorrência – 24,6% (51 de 207 tumores) – e sua correlação com parâmetros clínico-patológicos em 126 pacientes com CPT, demonstrando que a mutação *BRAF* apresentava correlação significativa com metástase ($p=0,033$) e estágio clínico ($p=0,049$).

Desde a descoberta inicial da mutação *BRAF*, foram identificados mais de 40 mutações no gene *BRAF*, entre as quais a mutação de ponto T1799A (*BRAF*^{T1799A}), considerada a mutação mais comum, representando mais de 90% de todas as mutações encontradas no gene *BRAF* (DAVIES *et al.*, 2002).

Esta mutação decorre da substituição do nucleotídeo timina por adenina na posição 1799 do gene *BRAF*, resultando na substituição de valina por glutamato no códon 600 (V600E) da proteína *BRAF*, resultando em ativação constitutiva e oncogênica da *BRAF* quinase mutante (WAN *et al.*, 2004). Outras mutações de *BRAF* só raramente são encontradas no câncer da tireoide, como o *BRAF*^{V600E} K601E, AKAP9-*BRAF*^{V600E}, V599ins *BRAF*^{V600E}, *BRAF*^{V600E} V600E_K601del e uma mutação recentemente caracterizada, V600D_FGLAT601-605ins, resultante de uma inserção de 18 nucleotídeos no T1799 de nucleotídeos do gene *BRAF*. Assim, a mutação T1799A é a principal mutação *BRAF* identificada no câncer da tireoide (HOU; LIU; XING, 2007; MORETI *et al.*, 2006; OLER *et al.*, 2005).

A mutação *BRAF*^{V600E} é uma alteração genética somática e não uma mutação da linha germinativa em câncer de tireoide familiar. Outro achado surpreendente na mutação *BRAF*^{V600E} é a sua ocorrência exclusiva em CPT ou carcinoma anaplásico derivado de CPT, com uma prevalência média de 44% no CPT e 24% nos anaplásicos derivados de CPT (HOU; XING, 2006; XING, 2005).

A alta prevalência e a alta especificidade da mutação *BRAF*^{V600E} no CPT sugere um papel patogênico fundamental desta mutação em CPT, o que trouxe um grande

entusiasmo nos últimos anos sobre a utilidade clínica potencial dessa mutação como um marcador molecular prognóstico e como um alvo eficaz para o tratamento do CPT (XING, 2007).

1.6.1 Associação entre mutação BRAF^{V600E} e características clínico-patológicas de alto risco no CPT

Muitos estudos têm investigado a relação da mutação BRAF^{V600E} com as características clínico-patológicas do CPT. Embora os resultados não sejam inteiramente consistentes, a maioria dos estudos, realizados em diferentes regiões geográficas e etnias, demonstram uma associação significativa entre a mutação BRAF^{V600E} com uma ou mais características convencionais de alto risco no CPT (XING, 2007).

Em uma grande série de casos de CPT, uma associação significativa da mutação BRAF^{V600E} com invasão extratireoidiana e estágios avançados da doença (III e VI) foi relatada por Nikiforova *et al.* (2003) nos estados americanos. Em um estudo japonês, associação da mutação BRAF^{V600E} com estágios avançados da doença foi observada por Namba *et al.* (2003). Três estudos coreanos mostraram associação da mutação BRAF^{V600E} com metástases linfonodais e invasão extratireoidiana. Um deles mostrou uma associação independente da mutação BRAF^{V600E} com metástases linfonodais, mesmo após análise multivariada com ajuste para possíveis fatores de confusão (KIM *et al.*, 2006). Um estudo da Clínica Mayo realizado por Jin *et al.* (2006) também demonstrou uma associação significativa da mutação BRAF^{V600E} com metástase para linfonodos e invasão extratireoidiana.

Uma recente meta-análise revelou uma associação significativa da mutação BRAF^{V600E} com invasão extratireoidiana, metástase linfonodal e estágios avançados do CPT (LEE, 2007). Lupi *et al.* (2007) relataram recentemente os resultados de um estudo com 500 casos de PTC em uma homogênea coorte italiana de uma única instituição. Este estudo demonstrou uma forte associação da mutação BRAF^{V600E} com invasão extratireoidiana, metástase para linfonodos e estágios avançados do tumor. Curiosamente, também foi encontrada associação da mutação BRAF^{V600E} com a falta de cápsula do tumor. Tem sido demonstrado que os CPT sem cápsula são associados a um maior risco de metástases e recorrência (LUPI *et al.*, 2007). Amplo estudo americano sobre CPT também confirmou alguns dos resultados anteriores, incluindo a associação

da mutação BRAF^{V600E} com metástase linfonodal e estágios avançados do tumor (III e IV) (KEBEBEW *et al.*,2007).

Em um abrangente estudo multicêntrico internacional, Xing *et al.* (2005) relataram uma estreita associação da mutação BRAF^{V600E} com invasão extratireoidiana, metástases linfonodais e estágios avançados. Da mesma forma, três estudos recentes, dos Estados Unidos, Espanha e Itália, demonstraram uma associação significativa da mutação BRAF^{V600E} com invasão extratireoidiana e estágios avançados. O estudo italiano demonstrou ainda associação com metástases para linfonodos. Em consonância com estes achados, vários estudos observaram uma alta prevalência da mutação BRAF^{V600E} nos linfonodos metastáticos (OLER *et al.*, 2005; SAPIO *et al.*,2006).

Entre os diversos subtipos de CPT, a mutação BRAF^{V600E} ocorreu mais comumente no subtipo células altas, seguido do CPT convencional ou clássico e menos comumente na variante folicular, com uma prevalência média de 77, 60 e 12%, respectivamente. Essa estreita associação da mutação BRAF^{V600E} com subtipos agressivos do CPT é em si forte evidência para o papel da mutação BRAF^{V600E} na determinação da agressividade deste tumor. Em comparação com CPT convencional, o subtipo células altas é mais agressivo (com mais metástases e recidivas), mesmo quando fatores de confusão são atenuados, incluindo idade, sexo, dimensão do tumor, extensão extratireoidiana, tipo de terapia e seguimento em longo prazo. Isso pode ser explicado por um papel patogênico independente da mutação BRAF^{V600E}, que ocorre mais comumente no subtipo células alta de CPT. Alguns estudos também encontraram uma correlação da mutação BRAF^{V600E} com alto risco em pacientes com CPT convencional e variante folicular (KEBEBEW *et al.*,2007; NAMBA *et al.*, 2003).

Associação da mutação BRAF^{V600E} com maior tamanho do tumor é relatada em vários estudos (KIM *et al.*, 2006). No entanto, um estudo com maior número de pacientes, a mutação BRAF^{V600E} foi associada a menor tamanho do tumor (XING *et al.*,2005). Por conseguinte, parece que a mutação BRAF^{V600E} promove maior agressividade do carcinoma, promovendo a sua capacidade de invasão e metástase.

A mutação BRAF^{V600E} é observada principalmente em adultos e raramente é vista em populações pediátricas (CIAMPI; NIKIFOROV 2007). Mesmo em populações adultas, uma associação da mutação BRAF^{V600E} com idade avançada foi demonstrada em vários estudos (NIKIFOROVA *et al.*, 2003). A associação da mutação BRAF^{V600E} com o sexo masculino também tem sido observada em alguns estudos. A predileção da mutação BRAF^{V600E} para pacientes de maior idade e do sexo masculino pode explicar

em parte a conhecida associação da terceira idade e sexo masculino com um maior risco de progressão e agressividade do carcinoma de tiróide (KIM *et al.*,2006).

Quando todos os estudos que contêm informações suficientes para calcular o número de casos analisados são agrupados, uma associação significativa entre mutação do gene *BRAF* com invasão extratireoidiana, metástases linfonodais e os estágios III e IV, é claramente demonstrada, com razões de chances de 2,50 [intervalo de confiança 95%(IC95%), 2,11-2,97], 1,83 (IC95%, 1,58 -2,13), e 2,14 (IC95%, 1,79 -2,56), respectivamente (XING, 2007).

1.6.2 Associação entre mutação *BRAF*^{V600E} e recorrência do CPT

O valor preditivo da mutação *BRAF*^{V600E} para a recorrência do CPT tem sido extensivamente investigado nos últimos anos. Xing *et al.* (2005), em inquérito multicêntrico de 219 pacientes com CPT, além de demonstrarem a associação da mutação *BRAF*^{V600E} com várias características clínico-patológicas de alto risco, como invasão extratireoidiana, metástase linfonodal, tumores em estágios avançados e subtipos histológicos agressivos, evidenciaram uma estreita associação da mutação do gene *BRAF* com a recorrência do CPT, em um tempo de seguimento clínico médio de 15 meses. Odds ratio de 4,0 (IC 95%, 1,1-14,1; $p=0,03$) para recorrência do câncer em pacientes com a mutação *BRAF*^{V600E} foi obtido na multivariada análise com ajuste para todos os clássicos fatores de confusão, incluindo os subtipos de tumor e a história de tratamento com radioiodo. Curiosamente, a associação entre mutação *BRAF*^{V600E} e recorrência do CPT foi encontrada mesmo em um subgrupo de pacientes com baixo grau clínico inicial (estágios I e II), classicamente associados a um baixo risco de recorrência. Essa associação também se manteve significativa na análise multivariada com ajuste para todos os conhecidos fatores de confusão clínico-patológicas (XING, 2007).

Estudo coreano de Kim *et al.* (2006) também demonstrou uma associação estreita da mutação *BRAF*^{V600E} com recorrência do tumor em uma série de 203 pacientes com CPT convencional. Um recente estudo espanhol realizado por Riesco-Eizaguirre *et al.* (2006) também demonstraram uma forte associação da mutação do *BRAF*^{V600E} com a recorrência do CPT. Mais recentemente, em um grande estudo americano sobre CPT, Kebebew *et al.* (2007) também demonstraram uma significativa associação da mutação *BRAF*^{V600E} com recorrência ou persistência da doença. Semelhante ao estudo de Kim *et*

al. (2006), Kebebew *et al.* (2006) mostraram um papel significativo da mutação BRAF^{V600E} sobre a recorrência tumoral quando apenas CPT convencionais foram examinados. Confirmando os achados de Xing *et al.* (2005) Kebebew, *et al.* (2006) também mostraram uma associação independente da mutação BRAF^{V600E} com a recorrência do CPT na análise multivariada com ajuste para fatores de confusão. Conforme demonstrado no estudo de Xing *et al.* (2005), Kebebew *et al.* (2006) também mostraram uma significativa associação da mutação BRAF^{V600E} com reincidência, mesmo em pacientes em estágio I. Em compilação, estes dados sugerem que, independentemente do risco inicial associado com os fatores clínicos, geográficos e étnicos, a mutação BRAF^{V600E} parece adicionar um risco maior de recorrência da doença. A odds-ratio global de cinco estudos para o risco de recorrência do CPT associado com a mutação BRAF^{V600E} é de 2,65 (IC 95%, 1,77-3,96; p<0,001).

1.6.3 Associação entre mutação BRAF^{V600E} e perda de avidéz ao radioiodo

A base do tratamento atual para o CPT após a tireoidectomia é a terapia de ablação com radioiodo. O tratamento mais eficaz para o CPT recorrente também é a radioiodoterapia. No entanto, o tumor de tireoide pode perder avidéz por radioiodo, resultando em fracasso do tratamento e aumento da morbidade e mortalidade pelo tumor (COOPER *et al.*, 2006; SHERMAN *et al.*, 2005). Embora vários fatores clínicos estejam sabidamente associados com risco aumentado de recorrência do câncer de tireoide, nenhum fator ainda foi identificado para predizer a perda de avidéz por iodo no tumor recorrente. Estudo realizado por Xing *et al.* (2005) mostrou uma associação interessante de BRAF^{V600E} com a perda da avidéz ao radioiodo na recidiva tumoral. Tumores recorrentes em pacientes com CPT primários que abrigam a mutação BRAF^{V600E} necessitam de tratamento mais agressivo, incluindo a necessidade de cirurgia e radioterapia externa, que os tumores recorrentes de pacientes sem mutação BRAF^{V600E}, que na maior parte das vezes necessitam apenas de repetição do tratamento com radioiodo (XING *et al.*, 2005). A tendência de associação da mutação BRAF^{V600E} no CPT primário ou recorrente com perda de avidéz ao iodo foi observada em dois estudos recentes, embora não tenham alcançado significância estatística, provavelmente devido ao número relativamente pequeno de casos estudados (RIESCO-EIZAGUIRRE *et al.*, 2006).

1.6.4 Bases moleculares para maior grau de invasão e progressão do CPT associado à mutação BRAF^{V600E}

Diversos mecanismos moleculares explicam a associação entre a mutação BRAF^{V600E} e tumorigênese no CPT. Esta mutação está associada com metilação aberrante e silenciamento de genes supressores tumorais, up-regulation de moléculas promotoras tumorais e silenciamento de genes responsáveis pela metabolização do iodo tireoidiano (KUMAGAIA *et al.*, 2006).

A capacidade de tumorigênese da mutação BRAF^{V600E} foi elegantemente demonstrada em camundongos transgênicos que desenvolveram CPT, através da expressão da proteína alvo BRAF^{V600E V600E} na glândula tireoide. Os tumores papilíferos de tireoide, que se desenvolveram nestes animais, evoluíram naturalmente para tumores pouco diferenciados, com uma alta frequência de invasão dos vasos sanguíneos e tecidos adjacentes, mimetizando os achados clínicos desta mutação em CPT de humanos. Estudos realizados em linhagens de células da tireoide de ratos mostraram que BRAF^{V600E V600E} promove a invasão de matrigel pelas células da tireoide. A matriz de matrigel utilizada neste ensaio é uma membrana basal polimerizada rica em proteínas extracelulares, imitando as condições fisiológicas para o crescimento celular. A migração de células cancerosas através da membrana matrigel é uma medida comumente utilizada para testar a capacidade de invasão das células tumorígenas. Inibidores de BRAF^{V600E} podem inibir o crescimento e proliferação de células que abrigam a mutação BRAF^{V600E V600E} (OUYANG *et al.*,2006).

Sugere-se ainda que alterações genéticas secundárias possam ocorrer após a mutação BRAF^{V600E} e que estas alterações podem desempenhar um papel especial na determinação da progressão e agressividade do CPT, ao contrário das demais mutações da via MAPK quinase, como RET/PTC e Ras. Aumento significativo de invasão celular do matrigel tem sido descrito com a indução da expressão de BRAF^{V600E}, mas não de RET/PTC, nestas células. Outros estudos demonstraram ainda que a expressão condicional do RET/PTC induz uma fraca atividade oncogênica em células da tireoide. Especula-se que eventos moleculares que são acoplados a BRAF^{V600E V600E} e não são compartilhados por outras alterações gênicas podem ser responsáveis pela agressividade do tumor exclusivamente associada com a mutação BRAF^{V600E} no CPT (WANG *et al.*, 2003 *apud* XING,2007).

2 JUSTIFICATIVA

Vários estudos têm demonstrado o aumento do risco de desenvolvimento de tumores benignos e malignos em pacientes acromegálicos, porém os dados da literatura são conflitantes. Adicionalmente, a verdadeira incidência de câncer de tireoide em acromegálicos e o impacto da atividade da doença no desenvolvimento de câncer de tireoide é desconhecida.

Também é escassa a disponibilidade de indicadores prognósticos moleculares em CPT. Porém, dentre os recentes avanços no entendimento da oncogênese tireoidiana, um dos mais promissores achados é a mutação BRAF^{V600E} como um potencial marcador diagnóstico e prognóstico do CPT. Dentre as neoplasias tireoidianas, esta mutação ocorre exclusivamente no CPT e em alguns carcinomas anaplásicos derivados de CPT. Muitos estudos evidenciam que esta mutação está associada com características clinicopatológicas associadas com maior agressividade, como por exemplo, a idade do paciente, invasão extratireoidiana, metástase linfonodal e estágios avançados do tumor. Além disso, associação direta da mutação BRAF^{V600E} com progressão clínica, recorrência e falência do tratamento do CPT tem sido demonstrada. A mutação BRAF^{V600E} também tem sido correlacionada com a recorrência do CPT em pacientes com tradicionais fatores associados ao baixo risco de progressão da doença. No entanto, estudos para avaliação da presença da mutação BRAF^{V600E} em pacientes acromegálicos acometidos por CPT não são relatados na literatura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação entre a acromegalia e a presença da mutação BRAF^{V600E} e a expressão imunohistoquímica de IGF-1 e galectina-3 no carcinoma papilífero de tireoide.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Descrever as características sócio-demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com CPT com e sem acromegalia;
- b) Determinar a prevalência da presença da mutação BRAF^{V600E} e da expressão imunohistoquímica de IGF-1 e galectina-3 nos tecidos tireoidianos de CPT de pacientes com e sem acromegalia;
- c) Determinar a prevalência de CPT em pacientes com acromegalia;
- d) Analisar a associação entre a ocorrência da mutação genômica de BRAF^{V600E} e as características sócio-demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com CPT com e sem acromegalia;
- e) Analisar a associação entre a expressão imunohistoquímica de IGF-1 e galectina-3 e as características sócio-demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com CPT com e sem acromegalia.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo, local e casuística (população e amostra):

Trata-se de um estudo transversal, observacional, multicêntrico, realizado no Ambulatório de Neuro-Endocrinologia do Serviço de Endocrinologia e Diabetes do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará (SED-HUWC-UFC), na cidade de Fortaleza-CE.

O estudo foi realizado durante o período de janeiro de 2009 a dezembro de 2011, através de cooperação entre diferentes serviços de endocrinologia do Brasil. O grupo final de pacientes acromegálicos com CPT foi constituído por 11 pacientes provenientes de diferentes centros do país, sendo 5 do Ceará, 2 de São Paulo, 2 de Brasília, 1 do Maranhão e 1 de Minas Gerais. O grupo comparativo foi constituído por 45 pacientes portadores de CPT sem acromegalia, oriundos de centros de referência em endocrinologia e em cirurgia de cabeça e pescoço do Estado do Ceará.

A população utilizada para a determinação da prevalência do CPT na acromegalia foi constituída por todos os casos de CPT diagnosticados na casuística total de acromegálicos seguida nas referidas instituições.

4.2 Diagnóstico de Acromegalia e de Carcinoma Papilífero de Tireóide:

O diagnóstico de acromegalia foi realizado baseado nas Recomendações do Departamento de Neuroendocrinologia da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia para o Diagnóstico e Tratamento da Acromegalia no Brasil, consistindo em: suspeita clínica de acromegalia, com dosagem de GH basal $> 0,4\text{ng/mL}$ e/ou IGF-1 elevado para sexo e idade, confirmado através de:

- a) Ausência de supressão do GH para $< 1,0\text{ ng/mL}$ no TOTG em não diabéticos ou
- b) GH médio (5 medidas a cada 30 min) $> 2,5\text{ng/mL}$ em pacientes diabéticos.

O diagnóstico de carcinoma papilífero de tireoide foi realizado tendo por base os resultados da análise histopatológica realizada por dois patologistas experientes em tireoide e em consonância com os critérios definidos pelo consenso: *The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition* (HEDINGER, 1989)

4.3 Critérios de exclusão:

Para a análise da mutação $BRAF^{V600E}$ e dos marcadores imunohistoquímicos IGF-1 e galectina-3, foram excluídos os indivíduos com história de irradiação cervical prévia, com história de carcinoma papilífero familiar, gestantes e lactantes, com peça cirúrgica indisponível ou material insuficiente para a análise imunohistoquímica.

4.4 Variáveis do estudo

As variáveis analisadas foram:

- a) dados clínicos: sexo, idade, história familiar de CPT, história de irradiação cervical prévia e duração do diagnóstico de acromegalia;
- b) características histopatológicas relacionadas ao diagnóstico de CPT: subtipo histopatológico, tamanho do tumor, invasão de cápsula, invasão angiolinfática, metástases linfonodais, metástases à distância, estadiamento TNM e índice prognóstico AMES;
- c) bioquímicas: dosagem de IGF-1 e GH, ambas por quimioluminescência;
- d) genéticas: mutação somática $BRAF^{V600E}$;
- e) imuno-histoquímica: expressão para IGF-1 e galectina-3.

As variáveis clínicas, histopatológicas e bioquímicas foram obtidas por meio de revisão dos prontuários. Para a obtenção das variáveis genéticas e imuno-histoquímicas, foram estudados os tecidos tireoidianos, obtidos por tireoidectomias, de pacientes acromegálicos com diagnóstico de CPT e dos pacientes do grupo comparativo e estes foram submetidas à análise molecular de *BRAF* e à imunohistoquímica para IGF-1 e galectina-3.

Todas estas análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Tireoide do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo sob a supervisão da Prof. Dra. Edna Kimura.

4.4.1 Análise da mutação BRAF^{V600E}:

A extração do DNA de tecido do carcinoma papilífero emblocados em parafina foi realizada utilizando o reagente Puregene® *DNA isolation kit* (Gentra Systems), após processo de deparafinização. O segmento genômico do exon 15 de BRAF foi amplificado utilizando 50-100ng de DNA genômico em volume total de 20 µL contendo 7,5 pmol de *primers* (FW 5´AAACTCTTCATAATGCTTGCTCTG3´ e RV 5´GGCCAAAATTTAATCAGTGA3´), 10 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, Taq DNA *Polymerasehigh fidelity* (Invitrogen) e tampão de PCR, submetidos a 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos, seguido de 5 minutos a 72 °C em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems/ Perkin Elmer). Essas condições foram otimizadas conforme análise dos padrões de bandas obtidos, após aplicação de uma amostra do volume final de reação em gel de agarose 1,8%, submetidos a 35 ciclos em termociclador com temperatura de anelamento de 58 °C. Este amplificado foi utilizado para análise por *Single-strand conformation polymorphism* (SSCP) ou por *Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reation* (PCR-RFLP) dependendo da quantidade de DNA extraído.

O ensaio de SSCP foi realizado após diluição e denaturação com DNA *gel-loading buffer* (95% formamida, 10 mM NaOH, 0,25% *bromophenol blue*, 0,25% *xylene cyanol*) e incubação por 94 °C por 5 minutos. A amostra foi colocada para eletroforese em gel 0,6% MDE™ de poliacrilamida (*BioWhittaker Molecular Applications*) contendo 10% de glicerol em tampão de TBE 0,6x a 8W por 6h à temperatura ambiente. As imagens da banda foram reveladas pela coloração de prata e a mutação detectada pela presença da banda de migração anômala comparando a da amostra de DNA com mutação previamente reconhecida e do DNA normal.

O Ensaio PCR-RFLP foi realizado para criar um sítio de restrição para a enzima Xba1 no amplificado derivado da amostra de DNA mutante, sendo utilizado o *primer* FW com “*mismatch* de duas bases” 5´ TAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTCTAG 3´ e RV 5´ ACTATGAAATACTATAGTTGAGA 3´, em condições especificadas em PCR (46). O amplificado de 195 pb foi purificado como *MiniElute PCR purification lita* (Qiagen) e digerido com 5 U de XbaI por 2 horas e observado em eletroforese de gel deacrilamida 10% corado com brometo de etídio. No amplificado mutante foi observado uma banda adicional de 165 pb.

A figura 2 exemplifica um eletroferograma representativo do sequenciamento do exon 15 do gene *BRAF* a partir de DNA genômico extraído de blocos de parafina de tecido com diagnóstico de carcinoma papilífero de tireóide (CPT).

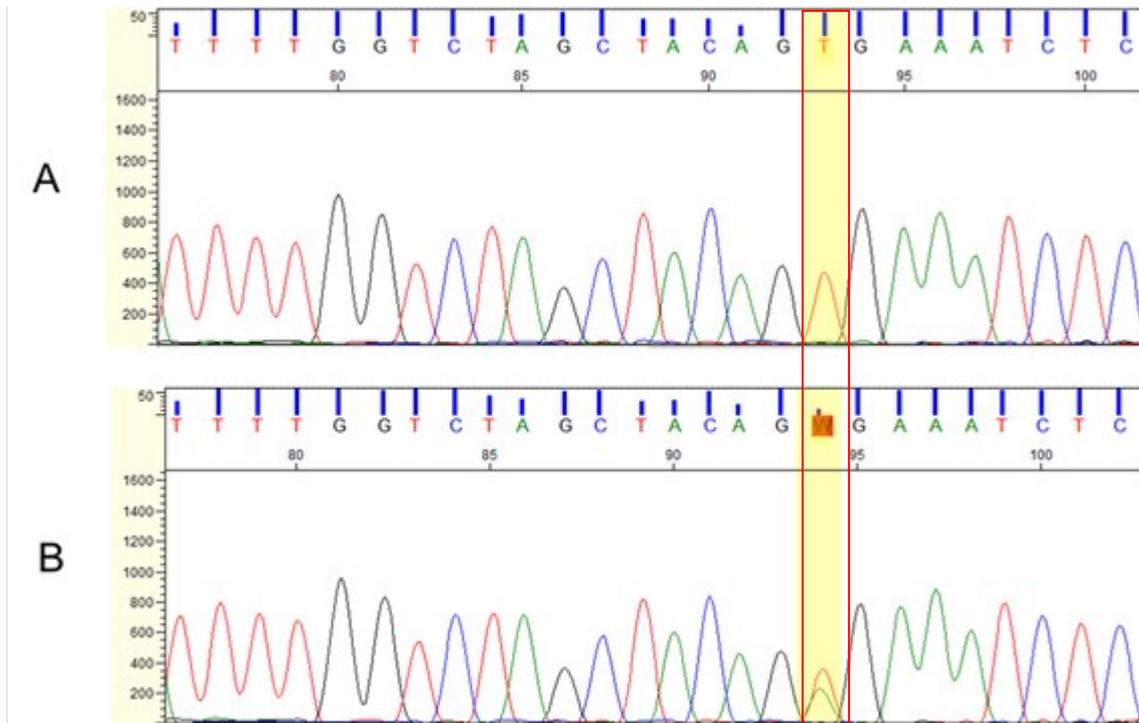


Figura 2. Eletroferograma representativo do sequenciamento do exon 15 do gene *BRAF* a partir de DNA genômico extraído de blocos de parafina de tecido com diagnóstico de carcinoma papilífero de tireoide (CPT). A: amostra de CPT selvagem para o gene *BRAF* apresenta somente o pico do nucleotídeo timina, em vermelho; B: amostra de CPT com mutação *BRAF*^{V600E} (transversão do nucleotídeo timina por adenina na posição 1799) em heterozigose apresenta dois picos, o da timina e o da adenina, em verde.

4.4.2 Ensaio Imuno-histoquímico (IHQ):

Os anticorpos anti-IGF e anti-galectina-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), assim como anticorpos secundários e os substratos para detecção do complexo antígeno-anticorpo foram adquiridos das empresas Santa Cruz, Biotechnology, Sigma, DAKO (47,48). Quando disponíveis foram adquiridos os peptídeos correspondentes para ensaio de imuno-absorção prévia, incubando o anticorpo ao antígeno para controle metodológico. O controle negativo foi realizado com cortes histológicos de tecido hepático. Foram utilizados cortes histológicos de carcinoma papilífero de tireoide emblocados em parafina. Estes cortes histológicos foram deparafinados antes da incubação com anticorpo primário *overnight*. A concentração do anticorpo utilizado foi padronizada previamente. Após revelação, foi realizada a contra-coloração com

Hematoxilina Gill. A reação IHQ foi observada e analisada ao microscópio de luz *Eclipse E600* (NIKON), imagens de diferentes regiões de tecidos foram capturadas por sistema digital. A imunexpressão foi graduada segundo critérios de intensidade e extensão no tecido, com captura das imagens e utilização de *software* específico, que permitiu comparação das amostras. Foram consideradas amostras com forte imunexpressão para os marcadores IGF-1 e galectina-3 aquelas que apresentaram intensidade ++ ou +++.

4.5 Análise estatística:

Para facilitar a análise e visualização dos dados, estes foram organizados e agrupados de acordo com o objetivo do estudo e dispostos em tabelas e gráficos, elaborados nos programas Microsoft Excel e Microsoft Word, versão 2007 (Microsoft Co, USA). Em seguida foram submetidas à análise estatística, sendo utilizado para esse fim, os programas Graphpad Prism, versão 3.0 (Graphpad Software Inc, CA, USA) e SPSS versão 13.0.

As variáveis foram descritas conforme o tipo: se quantitativas contínuas, por meio de média e desvio padrão da média (DP); e se categóricas através de proporções. O teste exato de Fischer e chi-quadrado foram utilizados na avaliação das variáveis categóricas. Para avaliação das diferenças de médias entre as variáveis contínuas paramétricas foi utilizado o *t-test* e para as não-paramétricas o teste de *Mann-Whitney*.

As variáveis que apresentaram associação com a mutação BRAF^{V600E} na análise univariada, utilizando-se como critério para seleção a ocorrência de $p < 0,100$, foram submetidas à análise de regressão logística multivariada, a fim de se avaliar no contexto multidimensional que fatores permaneceram associados, conjuntamente e de modo estatisticamente significativo, à presença da mutação BRAF^{V600E}.

A significância estatística foi alcançada ao nível de 5%.

4.6 Aspectos éticos:

Este estudo respeitou os preceitos éticos da pesquisa em seres humanos e não apresentou qualquer possibilidade de danos à dimensão física, biológica, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase da

pesquisa ou decorrente dela. Este trabalho não acarretou agravo imediato ou tardio à coletividade.

Os resultados dos exames laboratoriais obtidos por esta pesquisa estão prontamente disponibilizados para o médico assistente e também estão à disposição do paciente. Os dados e resultados obtidos neste estudo poderão ser apresentados em congressos e/ou publicados em revistas científicas. Serão tomados todos os cuidados no sentido de preservar, em qualquer situação, a identidade e a privacidade dos indivíduos incluídos neste estudo.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio-UFC, sob protocolo nº COMEPE 33/10 e assume perante o mesmo o compromisso de seguir fielmente os preceitos éticos contidos nas diretrizes e normas de pesquisa da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

4.7 Conflitos de Interesse:

Não existiram conflitos de interesse envolvidos nesta pesquisa.

5 RESULTADOS

Ao final do estudo foram incluídos, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2011, 56 pacientes, sendo 11 com diagnóstico de acromegalia e CPT e 45 portadores apenas de CPT. O grupo final de pacientes acromegálicos com CPT foi constituído por pacientes oriundos de diferentes centros do país, sendo 5 do Ceará, 2 de São Paulo, 2 de Brasília, 1 do Maranhão e 1 de Minas Gerais.

Para se estimar a prevalência de CPT em pacientes com acromegalia, foi realizado o levantamento do número total de casos de CPT (18) entre o total de pacientes acromegálicos (305) seguidos nas instituições envolvidas na pesquisa, sendo encontradas as seguintes prevalências: Minas Gerais (1/28; 3,5%), São Paulo (2/29; 6,8%), Maranhão (2/42; 4,7%), Brasília (7/136; 5,1%) e Ceará (6/70; 8,5%). A prevalência do CPT na casuística global em estudo foi de 5,9% (18/305).

A idade média dos pacientes acromegálicos com CPT foi de $61,55 \pm 6,02$ anos, sendo 72,7% (8/11) do sexo feminino. Em virtude da impossibilidade de obtenção das informações clínico-patológicas e de imunexpressão de todos os pacientes estudados, as análises foram realizadas considerando-se apenas os indivíduos com informações completas para a variável em estudo. Na tabela 1 são mostradas as variáveis clínico-patológicas relacionadas ao CPT do grupo de pacientes com acromegalia.

Tabela 1 – Características clínico-patológicas relacionadas ao carcinoma papilífero de tireoide do grupo de pacientes com acromegalia (n= 11). Fortaleza – CE, 2012.

Tamanho do tumor de tireoide em cm (média \pm DP; mín a máx)	1,45 \pm 0,76 0,70 a 2,90
Micropapilífero (tumor \leq 1,0 cm) (%)	22,2 (2/9)
Invasão capsular (%)	0
Tumor multifocal (%)	33,3 (3/9)
Metástase para linfonodos (%)	0
Invasão angiolímfática (%)	0
Metástase a distância(%)	0
Subtipo histopatológico (%)	
Variante clássica	90,9 (10/11)
Células altas	9,1 (1/11)
Alto Risco pelo Índice Prognóstico de AMES (%)	0
Estadiamento TNM (%)	
Estágio I	88,9 (8/9)
Estágio II	11,1 (1/9)
Estágio III	0
Estágio IV	0

Abreviaturas: SD: desvio-padrão; AMES: *age of the patient, metastases of the tumor, extent of primary tumor, size of the tumor.*

Em média, o tempo de diagnóstico da acromegalia foi de $7,72 \pm 3,90$ anos, variando de 2 a 15 anos e o tempo decorrido entre o diagnóstico da acromegalia e o diagnóstico do CPT foi de $3,43 \pm 2,71$ anos, variando de 1 a 9 anos. Na tabela 2 são mostradas as variáveis relacionadas ao diagnóstico e tratamento da acromegalia.

Tabela 2 – Características relacionadas ao diagnóstico e tratamento da acromegalia (n = 11). Fortaleza – CE, 2012.

Níveis de IGF-1 ao diagnóstico do CPT em ng/mL (média \pm DP; mín a máx)	417,00 \pm 285,09 102,00 a 945,00
Níveis de GH ao diagnóstico do CPT em ng/mL (média \pm DP; mín a máx)	4,75 \pm 4,86 0,44 a 16,40
Tamanho do tumor de hipófise em cm (média \pm DP; mín a máx)	1,40 \pm 0,64 0,60 a 2,40
Invasão de quiasma óptico (%)	10,0 (1/10)
Invasão de seio cavernoso (%)	10,0 (1/10)
Tratamento cirúrgico (hipofisectomia) (%)	70,0 (7/10)
Tratamento farmacológico (análogos da somatostatina) (%)	80,0 (8/10)
Radioterapia (%)	20,0 (2/10)

Abreviaturas: CPT: carcinoma papilífero de tireoide; SD: desvio-padrão; IGF-1: fator de crescimento insulina-símile; GH: hormônio de crescimento.

O grupo comparativo foi constituído por pacientes portadores de CPT sem acromegalia oriundos dos centros de endocrinologia e de cirurgia de cabeça e pescoço do Estado do Ceará. A idade média dos pacientes com CPT sem acromegalia foi de $49,02 \pm 15,83$ anos, sendo 84,4% (38/45) do sexo feminino. Não houve diferença estatisticamente significativa para a proporção de pacientes com tumores micropapilíferos, tumores multifocais, presença de metástases à distância, subtipo histopatológico, estadiamento TNM e índice prognóstico AMES entre os grupos com e sem acromegalia. A descrição das características clínico-patológicas relacionadas ao carcinoma papilífero de tireoide no grupo de pacientes com CPT sem acromegalia estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Características clínico-patológicas relacionadas ao carcinoma papilífero de tireoide do grupo de pacientes com CPT sem acromegalia (n = 45). Fortaleza – CE, 2012.

Tamanho do tumor de tireoide em cm (média ± DP; mín a máx)	2,42 ± 1,55 0,5 a 7,0
Micropapilífero (tumor ≤ 1,0 cm) (%)	17,8 (8/45)
Invasão capsular (%)	47,7 (21/44)
Tumor multifocal (%)	35,0 (14/40)
Metástase para linfonodos (%)	35,0 (14/40)
Invasão angiolinfática (%)	37,8 (17/45)
Metástase a distância(%)	2,9 (1/35)
Subtipo histopatológico (%)	
Variante clássica	57,8 (26/45)
Células altas	4,4 (2/45)
Folicular	26,7 (12/45)
Clássica - folicular	8,9 (4/45)
Cribiforme-morular	2,2 (1/45)
Alto Risco pelo Índice Prognóstico de AMES (%)	12,5 (4/32)
Estadiamento TNM (%)	
Estágio I	68,7 (22/32)
Estágio II	9,4 (3/32)
Estágio III	3,1 (1/32)
Estágio IV	18,8 (6/32)

Abreviaturas: CPT: carcinoma papilífero de tireoide; SD: desvio-padrão; AMES: *age of the patient, metastases of the tumor, extent of primary tumor, size of the tumor.*

A presença da mutação $BRAF^{V600E}$ foi avaliada pela técnica de SSCP previamente descrita. A figura 3 ilustra os resultados obtidos por eletroforese.

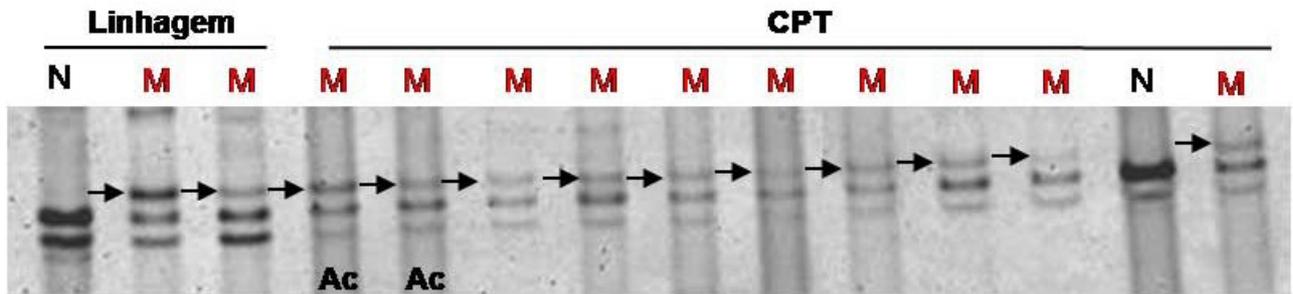


Figura 3 – Eletroforese para análise da mutação $BRAF^{T1799A}$ pela técnica de SSCP em tecido de CPT. O DNA genômico das amostras foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos para a região do éxon 15 do gene *BRAF* (*hotspot* para a mutação). A presença de banda adicional (seta) corresponde ao alelo mutado $BRAF^{T1799A}$. Pacientes acromegálicos representados pelas iniciais Ac. Como controles, foi utilizado DNA de linhagens celulares de câncer com *status BRAF* conhecido. N= sem mutação; M= com mutação.

Foram determinadas as prevalências da presença da mutação $BRAF^{V600E}$ e dos marcadores imunohistoquímicos IGF-1 e galectina-3 nos tecidos tireoidianos oriundos de tireoidectomia dos pacientes com CPT com e sem acromegalia. Houve uma maior prevalência da mutação $BRAF^{V600E}$ (90,9%; 10/11), assim como uma maior proporção de pacientes com forte expressão imunohistoquímica para IGF-1 (88,9%; 8/9) no grupo de pacientes com CPT e acromegalia. Não houve diferença estatisticamente significativa para a expressão de galectina-3 entre os grupos. Estes resultados estão expostos na tabela 4.

Tabela 4 – Prevalência da presença da mutação BRAF^{V600E} e dos marcadores imunohistoquímicos IGF-1 e galectina-3 nos grupos com acromegalia e CPT versus CPT (n=56). Fortaleza – CE, 2012.

	ACRO + CPT (n=11)	CPT (n=45)	<i>p</i> Razão de Prevalência (Intervalo confiança 95%)
Mutação BRAF ^{V600E} (%)	90,9 (10/11)	55,6 (25/45)	0,039 RP: 1,63 IC95% (1,19 - 2,26)
Forte imunoeexpressão para IGF-1 (%)	88,9 (8/9)	38,1 (8/21)	0,017 RP: 2,34 IC95% (1,30 - 4,22)
Forte imunoeexpressão para galectina-3 (%)	63,6 (7/11)	90,5 (19/21)	0,148

Abreviaturas: CPT: carcinoma papilífero de tireoide; ACRO: acromegalia; BRAF^{V600E}: mutação de B-Raf quinase; IHQ: imunohistoquímica; IGF-1: fator de crescimento insulina-símile.

Para se avaliar a associação entre as variáveis sócio-demográficas, clínico-patológicas e imunohistoquímicas e a presença da mutação BRAF^{V600E}, os pacientes foram divididos de acordo com a sua presença e foram realizadas análises de associação univariada entre os grupos com mutação BRAF^{V600E} presente *versus* mutação BRAF^{V600E} ausente.

Apenas a presença de acromegalia foi associada com a presença da mutação BRAF^{V600E} de modo estatisticamente significativo ($p=0,039$; RP: 1,63; IC95%: 1,19 - 2,26). Os resultados da análise univariada entre os grupos estão expostos na tabela 5.

Tabela 5 – Análise de associação entre variáveis clínico-epidemiológicas e imunohistoquímicas e presença da mutação BRAF^{V600E} em pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=56). Fortaleza – CE, 2012.

	Mutação BRAF ^{V600E} presente (n=35)	Mutação BRAF ^{V600E} ausente (n=21)	<i>p</i>
Idade (média ± SD)	54,7 ± 13,18	46,52 ± 16,91	0,068
Sexo feminino (%)	74,3 (26/35)	95,2 (20/21)	0,072
Acromegalia (%)	28,6 (10/35)	4,8 (1/21)	0,039
Imuno-expressão forte para IGF-1 (%)	45,0 (9/20)	70,0 (7/10)	0,260
Imuno-expressão forte para galectina-3 (%)	72,7 (16/22)	100,0 (10/10)	0,142
Tamanho do tumor de tireóide em cm (média ± SD)	2,36 ± 1,63	1,99 ± 1,21	0,653
Micropapilífero (%)	25,7 (9/35)	19,0 (4/21)	0,747
Invasão capsular (%)	31,3 (10/32)	52,4 (11/21)	0,157
Tumor multifocal (%)	31,0 (9/29)	40,0 (8/20)	0,555
Metástase para linfonodos (%)	27,6 (8/29)	30,0 (6/20)	1,000
Invasão angiolinfática (%)	30,3 (10/33)	33,3 (7/21)	1,000
Metástase a distância(%)	3,3 (1/30)	0	1,000
Subtipo histopatológico (%)			0,672
Variante Clássica	62,9 (22/35)	66,7 (14/21)	
Células altas	5,7 (2/35)	4,8 (1/21)	
Folicular	25,7 (9/35)	14,3 (3/21)	
Clássica-folicular	5,7 (2/35)	9,5 (2/21)	
Cribiforme-morular	0	4,8 (1/21)	
Alto Risco pelo Índice Prognóstico de AMES (%)	14,8 (4/27)	0	0,280
Estadiamento TNM (%)			0,221
Estágio I	66,7 (18/27)	85,7 (12/14)	
Estágio II	11,1 (3/27)	7,1 (1/14)	
Estágio III	0	7,1 (1/14)	
Estágio IV	22,2 (6/27)	0	

Abreviaturas: CPT: carcinoma papilífero de tireoide; ACRO: acromegalia; BRAF^{V600E}: mutação de B-Raf quinase; IHQ: imunohistoquímica; IGF-1: fator de crescimento insulina-símile; SD: desvio-padrão; AMES: *age of the patient, metastases of the tumor, extent of primary tumor, size of the tumor.*

A partir dos resultados da análise univariada foram selecionadas as variáveis idade ($p=0,068$), sexo ($p=0,072$) e acromegalia ($p=0,039$), que apresentaram $p < 0,100$, para inclusão em modelo de regressão logística multivariada. Com esse modelo, dos 56 pacientes estudados, houve 54 observações válidas, 96,4% da amostra. Pela estratégia *stepwise-backward*, utilizando-se a estatística de Wald, ao nível de significância de 5%, em função das variáveis descritas acima, encontrou-se que a presença de acromegalia associou-se de modo marginal à presença da mutação BRAF^{V600E} (tabela 6).

Tabela 6 - Análise de regressão logística multivariada para presença da mutação BRAF^{V600E} em pacientes com CPT (n=54). Fortaleza – CE, 2012.

	<i>p</i>	Razão de Prevalência	Intervalo de confiança 95%
Acromegalia	0,055	8,393	0,955 – 61,826

Abreviaturas: CPT: carcinoma papilífero de tireoide; BRAF^{V600E}: mutação de B-Raf quinase

Após categorização dos pacientes submetidos à avaliação para expressão imunohistoquímica de IGF-1 (n=30) em grupos com e sem imunoexpressão forte para este marcador, observou-se associação estatisticamente significativa entre acromegalia e forte expressão imunohistoquímica de IGF-1 ($p=0,017$) (tabela 7).

Tabela 7 – Análise de associação entre variáveis clínico-epidemiológicas e

imunohistoquímicas e imunoexpressão para IGF-1 em pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=30). Fortaleza – CE, 2012.

	Presença de forte imunoexpressão para IGF-1 (n=16)	Ausência de forte imunoexpressão para IGF-1 (n=14)	<i>p</i> Razão de Prevalência (Intervalo de confiança 95%)
Idade (média ± SD)	57,25 ± 11,18	53,92 ± 13,73	0,471
Sexo feminino (%)	81,2 (13/16)	71,4 (10/14)	0,675
Acromegalia (%)	50 (8/16)	7,1 (1/14)	0,017
Mutação BRAF ^{V600E} (%)	56,2 (9/16)	78,6 (11/14)	0,260
Imuno-expressão forte para galectina-3 (%)	87,5 (14/16)	85,7 (12/14)	1,000
Tamanho do tumor de tireóide em cm (média ± SD)	1,31 ± 0,73	2,00 ± 1,09	0,045
Micropapilífero (%)	50,0 (8/16)	21,4 (3/14)	0,142
Invasão capsular (%)	20,0 (3/15)	42,9 (6/14)	0,245
Tumor multifocal (%)	28,6 (4/14)	46,1 (6/13)	0,440
Metástase para linfonodos (%)	21,4 (3/14)	23,1 (3/13)	1,000
Invasão angiolinfática (%)	20,0 (3/15)	35,7 (5/14)	0,427
Metástase a distância(%)	0	7,1 (1/14)	0,483
Subtipo histopatológico (%)			0,377
Variante Clássica	75,0 (12/16)	57,1 (8/14)	
Clássica-folicular	6,2 (1/16)	0	
Folicular	12,5 (2/16)	35,7 (5/14)	
Células altas	6,2 (1/16)	7,2 (1/14)	
Alto Risco pelo Índice Prognóstico de AMES (%)	6,8 (1/15)	14,3 (2/14)	0,598
Estadiamento TNM (%)			0,636
Estágio I	86,8 (13/15)	64,3 (9/14)	
Estágio II	6,8 (1/15)	7,1 (1/14)	
Estágio III	0	7,1 (1/14)	
Estágio IV	6,8 (1/15)	21,4 (3/14)	

Abreviaturas: CPT: carcinoma papilífero de tireoide; ACRO: acromegalia; BRAF^{V600E}: mutação de B-Raf quinase; IHQ: imunohistoquímica; IGF-1: fator de crescimento insulina-símile; SD: desvio-padrão; AMES: *age of the patient, metastases of the tumor, extent of primary tumor, size of the tumor.*

Ao ser realizada análise de correlação linear, foi observada tendência de correlação positiva entre o grau de expressão imunohistoquímica de IGF-1 e o tamanho tumoral nos pacientes acromegálicos. Não foi observada correlação entre a imunoexpressão de IGF-1 e o tamanho do tumor nos pacientes sem acromegalia (gráfico 1).

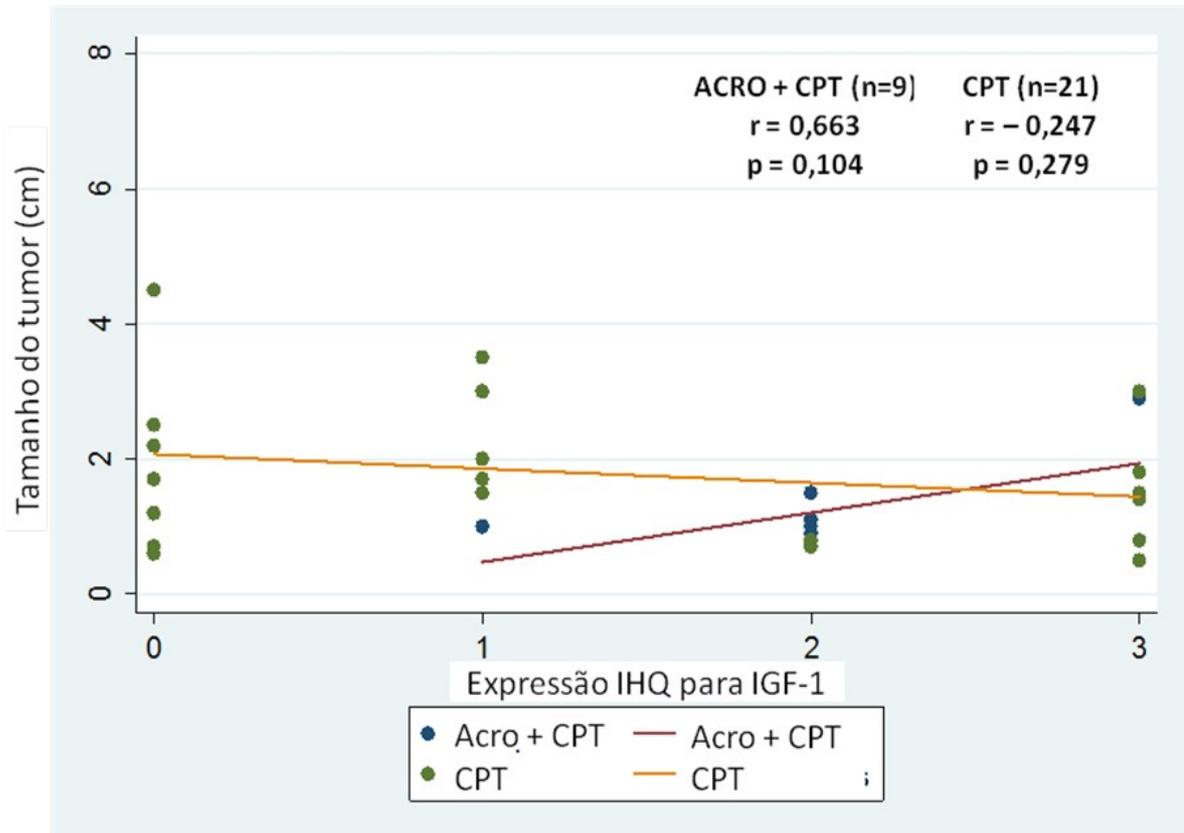


Gráfico 1: Correlação linear entre expressão IHQ para IGF-1 e tamanho tumoral nos pacientes com e sem acromegalia (n=30).

Quando os pacientes submetidos à avaliação para expressão imunohistoquímica de galectina-3 (n=32) foram categorizados em grupos com e sem forte imunoexpressão para este marcador, não se observou associação estatisticamente significativa entre as variáveis do estudo (tabela 8).

Tabela 8 – Análise de associação entre variáveis clínico-epidemiológicas e imunohistoquímicas e imunopressão para galectina-3 em pacientes com CPT com e sem acromegalia (n=32). Fortaleza – CE, 2012.

	Presença de forte imunopressão para galectina-3 (n=26)	Ausência de forte imunopressão para galectina-3 (n=6)	<i>p</i> Razão de Prevalência (Intervalo de confiança 95%)
Idade (média ± SD)	56,11 ± 11,90	55,16 ± 13,36	0,864
Sexo feminino (%)	80,7 (21/26)	66,7 (4/6)	0,590
Acromegalia (%)	26,9 (7/26)	66,7 (4/6)	0,148
Mutação BRAF ^{V600E} (%)	61,5 (16/26)	100,0 (6/6)	0,142
Imuno-expressão forte para IGF-1 (%)	53,8 (14/26)	50,0 (2/4)	1,000
Tamanho do tumor de tireoide em cm (média ± SD)	1,63 ± 0,94	1,73 ± 1,08	0,865
Micropapilífero (%)	34,6 (9/26)	33,3 (2/6)	1,000
Invasão capsular (%)	32,0 (8/25)	20,0 (1/5)	1,000
Tumor multifocal (%)	34,8 (8/23)	40,0 (2/5)	1,000
Metástase para linfonodos (%)	21,7 (5/23)	20,0 (1/5)	1,000
Invasão angiolinfática (%)	28,0 (7/25)	20,0 (1/5)	1,000
Metástase a distância(%)	4,0 (1/25)	0	1,000
Subtipo histopatológico (%)			0,627
Variante Clássica	69,3 (18/26)	66,7 (4/6)	
Clássica-folicular	3,8 (1/26)	0	
Folicular	23,1 (6/26)	16,7 (1/6)	
Células altas	3,8 (1/26)	16,7 (1/6)	
Alto Risco pelo Índice Prognóstico de AMES (%)	8,0 (2/25)	20,0 (1/5)	0,433
Estadiamento TNM (%)			0,764
Estágio I	76,0 (19/25)	80,0 (4/5)	
Estágio II	8,0 (2/25)	0	
Estágio III	4,0 (1/25)	0	
Estágio IV	12,0 (3/25)	20,0 (1/5)	

Abreviaturas: ACRO: acromegalia; CPT: carcinoma papilífero de tireoide; BRAF^{V600E}: mutação de B-Raf quinase; IHQ: imunohistoquímica; IGF-1: fator de crescimento insulina-símile; SD: desvio-padrão; AMES: *age of the patient, metastases of the tumor, extent of primary tumor, size of the tumor*.

A figura 4 ilustra a análise IHQ para IGF-1 e galectina-3 de espécimes de CPT estudados nesta série.

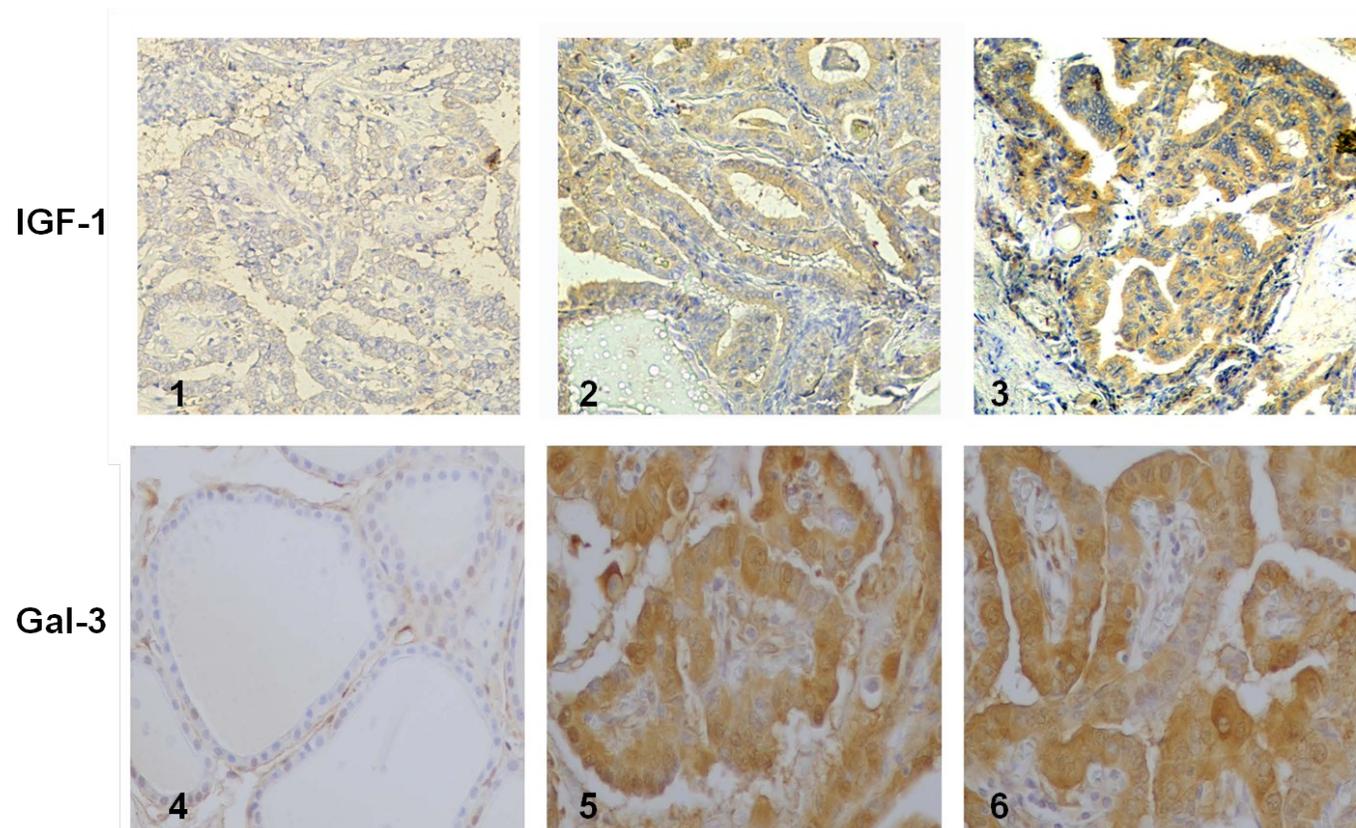


Figura 4 – Expressão imunohistoquímica de IGF-1 e galectina-3 em tecido tireoidiano. Imuno-expressão para IGF-1 fraca (1), moderada (2) e forte (3). Imuno-expressão para galectina-3 fraca (4) e forte (5 e 6).

6 DISCUSSÃO

Com a finalidade de avaliar a expressão de marcadores tumorais do CPT em pacientes acromegálicos, o presente estudo avaliou a presença da mutação BRAF^{V600E} e de marcadores imunohistoquímicos (IGF-1 e galectina-3) em espécimes de tecido tireoidiano oriundos de tireoidectomia.

Nesse estudo observou-se uma maior prevalência do sexo feminino, corroborando a maior prevalência de CPT neste gênero. Em virtude do diagnóstico tardio da acromegalia, observou-se uma faixa etária mais avançada dos pacientes com CPT acromegálicos *versus* grupo comparativo ($61,55 \pm 6,02$ anos vs. $49,02 \pm 15,83$ anos). Em média, o tempo de diagnóstico da acromegalia destes pacientes foi de $7,72 \pm 3,90$ anos, variando de 2 a 15 anos e o tempo decorrido entre o diagnóstico da acromegalia e o diagnóstico do CPT foi de $3,43 \pm 2,71$ anos, variando de 1 a 9 anos. A literatura ressalta que geralmente o carcinoma de tireoide se desenvolve após tempo prolongado de exposição (até 28 anos) a aumento de GH e IGF-1 (MARCHISOTTI *et al.*, 2005).

Os pacientes com acromegalia têm taxas mais elevadas de câncer, possivelmente devido ao aumento dos níveis plasmáticos de IGF-1, conhecido promotor do crescimento celular (SIEGEL; TOMER, 2005). Neste contexto, nas últimas décadas, vários autores vêm descrevendo maior incidência de neoplasias em acromegálicos. A dificuldade em se verificar essa associação deve-se à raridade da acromegalia – prevalência de 38 a 69 casos por milhão e incidência de três a quatro casos novos por ano – e também pelo aumento da expectativa de vida com o tratamento da doença de base. Os acromegálicos têm, atualmente, sobrevida maior e o desenvolvimento de malignidades, nesta população, pode estar relacionado intrinsecamente à idade (JENKINS; BESSER, 2001; MARCHISOTTI *et al.*, 2005).

Enquanto bócio simples e multinodular são mais comuns entre acromegálicos, estudos de prevalência de carcinoma de tireoide, considerada por alguns estudos, a neoplasia mais comum nos acromegálicos, são escassos, e sua real incidência não é clara (SIEGEL; TOMER *et al.*, 2005).

A prevalência de carcinoma tireoidiano desse estudo – 5,9% – está de acordo com os poucos relatos da literatura. Ruchala *et al.* (2009), avaliaram 86 pacientes acromegálicos e identificaram 5 casos de carcinoma tireoidiano (5,8%). Em 2010, Gullu *et al.* estudaram 105 acromegálicos e identificaram malignidade em 15% dos pacientes,

sendo 4,7% carcinomas tireoidianos, o tipo de câncer mais comumente encontrado nesta série, seguido de mama e cólon. O estudo de Tita *et al.* (2005) mostrou um aumento de 60 vezes na prevalência do câncer de tireoide nos pacientes com acromegalia (5,6% dos pacientes com acromegalia *versus* 0,1% da população geral de controle). Kurimoto *et al.* (2008), encontraram 4 casos (4,8%) em um universo de 83 pacientes que fizeram avaliação ultrassonográfica. Dos Santos *et al.*, 2012 encontraram prevalência de 7,2% de CPT (9/124), enquanto no grupo controle esta foi de 0,7% (2/263), com *odds ratio* de 10,21 ($p = 0,0011$, IC 95%: 2,17 – 48,01). Apesar destas estimativas, o número total de câncer de tireoide por série é muito pequeno e os mecanismos que explicam a associação com risco de câncer de tireoide são especulativos (RENEHAN, A.; O'DWYER, S.; SHALET, S., 2000).

No que se refere às características clínico-patológicas relacionadas ao CPT do grupo de acromegálicos, observou-se, conforme descrição na tabela 1, que a maioria dos acromegálicos apresentava CPT subtipo histológico do tipo variante clássica (90,9%; 10/11), tamanho tumoral médio de $1,45 \pm 0,76$ cm e 3 casos apresentavam tumor multifocal. Nenhum paciente apresentou invasão capsular, invasão angiolinfática ou metástases à distância, o que conferiu um estadiamento TNM 1 a 88,9 % (8/9) dos casos e apenas a um paciente a classificação TNM 2. Nenhum paciente fora classificado como alto risco pelo índice prognóstico AMES.

Em 2005, Marchisotti *et al.* estudaram uma série de 100 acromegálicos e encontraram 3 casos de neoplasia tireoidiana, sendo todos CPT variante clássica, sem achados de invasividade ou metástase à distância. Em 2009, Ruchala *et al.* avaliaram 75 pacientes acromegálicos quanto à presença de neoplasia tireoidiana e encontraram 5 casos de tumores tireoidianos, sendo 3 casos de CPT variante clássica e 2 casos de CPT variante folicular, onde 3 eram multifocais, 1 invadia a cápsula tireoidiana e 1 apresentava metástase linfonodal. Ainda que estudos revelem que os pacientes acromegálicos tenham quase 60 vezes mais chance de desenvolver neoplasia tireoidiana que a população geral (5,6% vs. 0,093%) (TITA *et al.*, 2005), os dados da literatura são limitados com relação à descrição dos subtipos destas neoplasias, provavelmente em virtude da baixa incidência de acromegalia.

Nesse estudo, observou-se que não houve diferença significativa quanto ao estadiamento TNM e índice prognóstico AMES entre os grupos com e sem acromegalia. No entanto, foi observado que os pacientes não acromegálicos apresentavam tumores de maior tamanho e uma elevada presença de características associadas a pior prognóstico.

Especula-se que no grupo de acromegálicos, rotineiramente submetidos a protocolos de rastreamento para neoplasias, o diagnóstico das lesões neoplásicas tireoidianas foi realizado mais precocemente, e por isso, exibiram um comportamento histopatológico mais favorável à época do diagnóstico.

Além dos tradicionais fatores prognósticos de alto risco, ressalta-se o esforço de diversos estudos em melhorar o panorama dos indicadores diagnósticos e prognósticos de carcinomas de tireoide, com foco no uso do perfil molecular e imunohistoquímico para caracterização dos tumores. No presente estudo foi avaliada a presença de uma mutação somática do gene *BRAF*, reconhecida como uma das alterações genéticas mais frequentes do CPT variante clássica, células altas e oncocíticas e do microcarcinoma papilífero na população adulta (KIMURA *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos sugere associação entre a presença da mutação $BRAF^{V600E}$ e fatores de pior prognóstico do CPT, como idade avançada, sexo masculino, invasão tumoral extratireodiana, metástase linfonodal e à distância, estágios tumorais avançados e até altas taxas de recorrência da doença (KEBEBEW *et al.*, 2007). Por outro lado, ressalta-se a controvérsia desta associação, uma vez que em outros estudos ela não ocorre ou é apenas parcialmente observada (ELISEI-R *et al.*, 2008).

Especula-se que a mutação $BRAF^{V600E}$ ocorra precocemente na carcinogênese do CPT, sendo mais prevalente em pacientes de maior idade. Um estudo italiano multicêntrico demonstrou que a mutação $BRAF^{V600E}$ foi significativamente mais frequente em pacientes de idade mais avançada, em particular naqueles acima de 60 anos. Este achado é consistente com os registros de que idade avançada ao diagnóstico é um fator de pior prognóstico na maioria dos escores de risco. (TITA *et al.*, 2005) No entanto, não se observou associação da mutação $BRAF^{V600E}$ com a variável idade nesse trabalho.

Também não foi observada associação entre tamanho tumoral e a mutação $BRAF^{V600E}$ nessa casuística ($p=0,65$). Mas se ressalta que associação da mutação $BRAF^{V600E}$ com tamanho do tumor tem sido relatada em vários estudos (KIM *et al.*, 2006). De fato, esta relação é contraditória, pois outros autores tem descrito que a mutação $BRAF^{V600E}$ pode estar associada a menor tamanho tumoral (TITA *et al.*, 2005; XING *et al.*, 2007).

Em 2012, Koperek *et al* avaliaram 144 casos de CPT e relataram que não houve diferença estatística na presença da proteína $BRAF^{V600E}$ entre os microcarcinomas e macrocarcinomas. Além disso, não foi observada qualquer correlação significativa entre

a presença da mutação e parâmetros clínico-patológicos de agressividade, como metástase linfonodal, infiltração peritumoral ou infiltração peritireoidiana. Neste trabalho a expressão da proteína BRAF^{V600E} foi significativamente mais comum em tumores do tipo células alta e oncocíticas, sendo menos comum nos tumores com padrão de crescimento folicular.

Devido à baixa frequência de metástases a distância CPT, principalmente em pacientes adultos, poucos estudos apresentam um número suficiente de casos para avaliar a relação entre metástases a distância e a mutação de BRAF^{V600E}. Dois grandes estudos que analisaram esta questão mostraram uma associação significativa entre a mutação BRAF^{V600E} e metástase a distância (XING, 2007).

Conforme discutido acima, embora a maioria dos estudos suporte uma associação positiva entre a mutação BRAF^{V600E} e fatores de alto risco convencionais, alguns estudos não têm confirmado este achado. Não há explicação definitiva para estes resultados contraditórios, mas o número relativamente pequeno de casos na maioria dos estudos "negativos" parece ser uma explicação. De fato, uma tendência clara de associação da mutação BRAF^{V600E} com fatores de alto risco foi observada em alguns desses estudos, embora sem significância estatística. Variações na extensão da doença no momento do diagnóstico inicial, na descrição dos dados patológicos e extensão do tumor no prontuário e variações nos critérios e protocolos utilizados para coleta de dados podem existir entre os diferentes estudos e podem ser parcialmente responsáveis pelos achados inconsistentes (XING, 2007). Além disso, a discrepância das relações entre a presença da mutação BRAF^{V600E} e fatores prognósticos do CPT pode ser justificada por outras condições, dentre as quais se destacam: fatores técnicos e geográficos, a falta de análise multivariada na maioria dos estudos, coortes com pequeno número de pacientes, inclusão de diferentes subtipos histológicos do carcinoma tireoidiano, falta de registros de seguimento fidedigno dos pacientes e de análises clínico-patológicas detalhadas (KEBEBEW *et al.*, 2007).

Como exposto anteriormente, ao serem os pacientes categorizados pela presença ou ausência da mutação BRAF^{V600E} (tabela 5) e comparados através de análise univariada, apenas a variável acromegalia se mostrou associada à presença da mutação BRAF^{V600E} ($p=0,039$), não se encontrando associação da mutação com sexo, idade, tamanho tumoral, critérios de agressividade histopatológicos, índice prognóstico AMES e estadiamento tumoral.

No entanto, como as variáveis sexo e idade apresentaram uma tendência estatística para associação com a mutação – $p < 0,100$ à análise univariada – optou-se pela inclusão destas, além da variável acromegalia, em um modelo de regressão logística multivariada. Esta análise revelou a acromegalia como única variável que apresentou uma tendência de associação independente à mutação BRAF^{V600E}, excluindo a eventual contribuição da idade ou sexo nesta associação. A partir desse achado, somado à prevalência quase absoluta da mutação BRAF^{V600E} nos acromegálicos (10/11; 90,9%), especula-se que há uma associação real entre a acromegalia e a mutação BRAF^{V600E}, porém o pequeno tamanho da amostra pode justificar o amplo intervalo de confiança encontrado no modelo de regressão logística. Esta dificuldade de análise multivariada em pacientes com a mutação BRAF^{V600E} tem sido descrita por outros autores (XING *et al.*, 2007).

Até o presente momento não se dispõe de dados da literatura que contemplem a associação entre a mutação BRAF^{V600E} e a acromegalia. Na realidade, os mecanismos que justificam este achado inédito são desconhecidos.

Neste contexto, destaca-se que esta mutação tem sido descrita em outros tumores que apresentam elevada incidência na acromegalia, como é o caso do câncer colorretal. [Rajagopalan *et al.* \(2002\)](#), ao avaliarem sistematicamente mutações no gene *BRAF* em 330 tumores colorretais de pacientes não acromegálicos, encontraram 32 mutações, sendo 28 mutações BRAF^{V600E}. Sabe-se ainda que, assim como na carcinogênese tireoidiana, alterações na via MAPK/ERK estão entre os principais determinantes da carcinogênese de tumores colorretais. Mais recentemente, a mutação BRAF^{V600E} também tem sido associada a fatores de pior prognóstico e a menor sobrevida em pacientes com carcinoma colorretal (PHIPPS *et al.*, 2012; OGINO *et al.*, 2012).

Adicionalmente, descreve-se uma elevada prevalência da mutação BRAF^{V600E} em melanomas. Nestes tumores, tem sido sugerido que a exposição ambiental a fatores específicos, no caso à radiação ultravioleta, contribui para a gênese desta mutação. Estes achados demonstram uma possível participação dos fenômenos epigenéticos na determinação da mutação BRAF^{V600E} (EDWARDS *et al.*, 2004). Se algum fator epigenético está envolvido na maior ocorrência da mutação BRAF^{V600E} em acromegálicos, e qual seria este fator, surgem como futuros desafios para a melhor compreensão destes mecanismos.

De fato, como já citado, ao longo das últimas décadas, vários estudos epidemiológicos e experimentos laboratoriais têm relacionado o sistema IGF/insulina

com risco aumentado para neoplasias (FUCHS *et al.*, 2008; CLAYTON *et al.*, 2011). Múltiplas vias de sinalização são ativadas após a interação entre o receptor de insulina ou IGF-1 e seus ligantes. Após ativação, estas vias de sinalização podem estimular múltiplos fenótipos neoplásicos, incluindo proliferação, proteção contra apoptose, invasão e metástase (WEI *et al.*, 2005).

Nesse contexto, duas hipóteses são consideradas: 1) sugere-se que precocemente no processo de carcinogênese, a bioatividade de IGF seja um fator crítico que determinará se a célula mutada sobreviverá e evoluirá para uma linhagem francamente maligna ou sofrerá apoptose, já que um meio rico em IGF-1 favorecerá a sinalização pró-sobrevivência da célula (KURMASHEVA; HOUGHTON, 2006; WOLPIN *et al.*, 2008); 2) especula-se que níveis elevados de IGF-1 simplesmente favoreceriam uma rápida proliferação celular da neoplasia em estágio inicial até um ponto onde esta seria clinicamente detectável. Assim, níveis de IGF-1 no limite superior da normalidade não implicariam na presença de câncer, mas sim refletiriam a presença de um meio favorável para carcinogênese e/ou progressão da neoplasia (FUCHS *et al.*, 2008).

As ações biológicas do IGF-1 são mediadas pela ativação do seu receptor (IGF1R), uma tirosina-quinase transmembrana relacionada à via MAPK/ERK quinase (RET / PTC – RAS – RAF – MEK – ERK), uma clássica via de sinalização intracelular que desempenha um papel fundamental sobre as funções celulares de proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência e, quando aberrantemente ativada, sobre a tumorigênese (MAC CORKLE; TAN, 2005; TORII *et al.*, 2004). Mutações que afetam esta via são consideradas como o início de eventos moleculares do CPT. (SEBOLT-LEOPOLD; HERRERA 2004).

Hilmi *et al.* (2008) demonstraram em estudos experimentais que células de melanoma portadoras da mutação BRAF^{V600E} expostas a meios com altas concentrações de IGF-1 são mais resistentes à apoptose. Possivelmente, os altos níveis plasmáticos de IGF-1 em acromegálicos contribuem para o desenvolvimento de CPT em pacientes geneticamente predispostos, como por exemplo, aqueles portadores da mutação BRAF^{V600E}.

Nesse estudo, todos os pacientes acromegálicos haviam sido tratados previamente para acromegalia com modalidades de tratamento padrão apresentadas na tabela 2. No entanto, a despeito do tratamento instituído e do presente estudo não ter sido desenhado para o estabelecimento de relações de causa-efeito, ressalta-se que os

níveis de IGF-1 e GH, ao diagnóstico do CPT, estavam elevados ($417,0 \pm 285,1$ ng/mL e $4,7 \pm 4,9$ ng/mL respectivamente).

Sabe-se que o IGF-1 é um importante fator de crescimento e diferenciação da tireoide, promovendo a proliferação das células tireoidianas normais pela potencialização do efeito mitogênico do TSH. Balkany *et al.* (1995) sugeriram que tumores da tireoide poderiam ser estimulados pelo aumento dos níveis circulantes de IGF-1. Sua suposição é favorecida pelo fato de existirem três vezes mais receptores de IGF-1 em tecido neoplásico tireoidiano do que em tecido normal (YASHIRO *et al.*, 1989). Takahashi *et al.* (1990) demonstraram que em culturas de células tireoidianas humanas havia produção de IGF-1, assim como a presença de seu receptor, tanto em células normais quanto em células neoplásicas, sendo que nestas últimas a concentração dos receptores de IGF-1 foi maior, sugerindo que o IGF-1 contribuiria para o crescimento anormal das células foliculares da tireoide. Este achado foi reforçado por MACIEL *et al.* (1995) em estudos utilizando técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ*. Além disso, estudos demonstraram que o IGF-1 promove a replicação do DNA de células tireoidianas cancerosas (HISHINUMA *et al.*, 1994).

A produção de IGF-1 por fibroblastos na glândula tireoide é efetuada de uma maneira GH dependente. Estudo de Gullu *et al.* em 2010 demonstrou que níveis iniciais elevados de GH estiveram associados ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com acromegalia ($p=0.046$), ao contrário do observado para os valores iniciais de IGF-1. Willians *et al.* (1989) mostraram que células foliculares de tumores benignos da tireoide passam a não necessitar do IGF-1 circulante e proliferam em resposta à produção autócrina de IGF-1 pelo tumor. Onoda *et al.* (1992) estenderam estes achados para células de tumores malignos de tireoide.

Frente a estas evidências, torna-se racional avaliar a expressão do IGF-1 em tecidos neoplásicos de paciente expostos a situações onde sabidamente há aumento do IGF-1 circulante, como a acromegalia. Neste contexto, Tita *et al.*, em 2005, avaliaram uma série de 125 acromegálicos e encontraram CPT diferenciado em 7 destes. À análise semi-quantitativa da expressão de IGF-1, por imunohistoquímica, observou-se imuno-expressão mais intensa no CPT dos indivíduos acromegálicos quando comparados aos não acromegálicos.

No presente estudo também foi observada diferença estatisticamente significativa quanto à imunoexpressão do IGF-1 no grupo acromegálico *versus* grupo comparativo ($p=0,017$). Além disso, observou-se, apenas nos pacientes com acromegalia, uma

tendência de correlação positiva entre o grau de expressão IHQ de IGF-1 em tecido de CPT e o tamanho tumoral, quando estas variáveis foram analisadas por regressão linear simples, fato não observado entre os pacientes sem acromegalia.

Ressalta-se ainda que, apesar dos pacientes sem imunopositividade forte para IGF-1 terem apresentado maior tamanho tumoral à análise univariada – realizada após categorização dos pacientes em dois grupos – à análise de regressão linear, não houve qualquer correlação entre o tamanho tumoral e o grau de imunopositividade de IGF-1.

Expressão de galectina tem sido descrita em tecido tireoidiano humano normal e em tumores de tireoide por vários pesquisadores (ORLANDI *et al.*, 1998; DANGUY *et al.*, 2002). Xu *et al.* examinaram a imunopositividade da galectina-3 em vários tecidos neoplásicos e não neoplásicos, sendo observada expressão deste marcador em todos os tipos de neoplasias da tireoide de origem epitelial (XU; EL-NAGGAR; LOTAN, 1995)

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar a expressão IHQ da galectina-3 em lesões da tireoide, com o objetivo de estudar o seu papel como um indicador diagnóstico, particularmente na diferenciação de situações problemáticas, nas quais os resultados são inconclusivos à técnica de coloração rotineira – hematoxilina-eosina. Numa série de relatos recentes, a galectina-3 foi encontrada superexpressa nos casos de neoplasia maligna da tireoide, não sendo detectável em tecido tireoidiano normal e não maligno (GASBARRI *et al.*, 1999; INOHARA, 1996 *apud* THAN *et al.*, 2008).

Por outro lado, a literatura traz recentes trabalhos, com achados controversos aos anteriormente citados, em que Jakubiak- Wielganowicz *et al.* (2003) e Mehrotra *et al.* (2004) demonstraram que a galectina-3 não é um marcador de IHQ confiável para distinguir lesões benignas e malignas da tireoide, e que não é um marcador altamente específico na diferenciação entre tumores foliculares benignos e malignos, embora possa ser utilizado como uma ferramenta adicional.

Nesse estudo não houve diferença estatisticamente significativa para a expressão de galectina-3 entre os pacientes com e sem acromegalia, conforme exposto na tabela 4. Adicionalmente, ao serem avaliados em grupos categorizados de acordo com a expressão de galectina-3, não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto às variáveis clínico-patológicas. Ressalta-se que nesta casuística todos os pacientes apresentavam CPT, portanto a galectina-3 não foi analisada como um marcador para a diferenciação entre lesões malignas e benignas da tireoide. Além disso, a expressão deste marcador foi registrada em apenas 32 pacientes, o que limitou a

análise estatística. Até o presente momento, não há descrição na literatura da expressão deste marcador em lesões tireoidianas neoplásicas em acromegálicos.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo avaliou a presença da mutação BRAF^{V600E} e de marcadores imunohistoquímicos (IGF-1 e galectina-3) em espécimes de CPT de pacientes acromegálicos e não acromegálicos, revelando uma elevada prevalência desta mutação – 90,9% – nos espécimes de CPT de pacientes acromegálicos, sugerindo que a acromegalia está associada de forma independente à presença da mutação BRAF^{V600E} em pacientes com CPT.

Nessa casuística, ao contrário do que é mais comumente descrito na população geral, a mutação BARF não se revelou um marcador de agressividade tumoral do CPT em pacientes com acromegalia.

Adicionalmente, destaca-se a elevada prevalência de CPT – 5,9% – em série de 305 acromegálicos seguidos em instituições de referência para o estudo desta condição.

Observou-se ainda forte expressão imunohistoquímica do marcador IGF-1 nos espécimes de CPT dos pacientes acromegálicos e correlação positiva entre o tamanho do tumor de tireoide e o grau de imunoexpressão para IGF-1.

Por outro lado, não se observou maior expressão da galectina-3 no grupo acromegálico estudado, assim como nenhuma associação deste marcador com as variáveis clínico-patológicas analisadas.

Até o presente não há descrição de associação entre acromegalia e presença da mutação BRAF^{V600E}. Além do entendimento acerca da patogênese molecular do CPT em acromegálicos, um potencial benefício do conhecimento da alteração genética BRAF^{V600E} em CPT de pacientes acromegálicos é a possibilidade da disponibilização, ainda em caráter experimental, de protocolos terapêuticos individualizados e de terapêuticas inibidoras de RAF quinase melhorando o prognóstico e a sobrevida destes pacientes.

REFERÊNCIAS

- AKSLEN, L. A.; LIVOLSI, V. A. Prognostic significance of histologic grading compared with subclassification of papillary thyroid carcinoma. *Cancer*, v. 88, n. 8, p. 1902-1908, 2000.
- BALKANY, C.; CUSHING, G. W. An association between acromegaly and thyroid carcinoma. *Thyroid*, v. 5, n. 1, p. 47-50, 1995.
- BARIS, D. *et al.* Acromegaly and cancer risk: a cohort study in Sweden and Denmark. *Cancer Causes and Control*, v. 13, n. 5, p. 395-400, 2002.
- CANDY, B., ROSSI, R. Na expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*. v. 104, p. 947-953, 1988.
- CHIARIOTTI, L. *et al.* Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors. *International journal of cancer*, v. 64, n. 3, p. 171-175, 1995.
- CIAMPI, R.; NIKIFOROV, Y. E. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*, v. 148, n. 3, p. 936-941, 2007.
- CLAYTON, P. E. *et al.* Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 7, n. 1, p. 11-24, 2010.
- COLONNA, M. *et al.* Incidence of thyroid cancer in adults recorded by French cancer registries (1978–1997). *European Journal of Cancer*, v. 38, n. 13, p. 1762-1768, 2002.
- COOPER, D.S.; DOHERTY, G.M.; HAUGEN, B.R. *et al.* Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, v. 16, p.109–142, 2006.
- DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1572, n. 2, p. 285-293, 2002.
- DAVIES, H., Mutations of the BRAF gene in human câncer. *Nature*. v. 417, n. 6892, p. 949-954, 2002.
- DOS SANTOS, M. C. C. *et al.* Thyroid cancer in patients with acromegaly: a case–control study. *Pituitary*, p. 1-6, 2012.
- EDWARDS, R. H. *et al.* Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J. Med. Genet.* v. 41, p. 270-272, 2004.
- ELISEI, R. *et al.* BRAFV600E mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 93, n. 10, p. 3943-3949, 2008.

EZZAT, S.; MELMED, S. Clinical review 18: Are patients with acromegaly at increased risk for neoplasia? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 72, n. 2, p. 245-249, 1991.

FIRTH, S. M. *et al.* Impaired blockade of insulin-like growth factor I (IGF-I)-induced hypoglycemia by IGF binding protein-3 analog with reduced ternary complex-forming ability. *Endocrinology*, v. 143, n. 5, p. 1669-1676, 2002.

FUCHS, C. S. *et al.* Plasma insulin-like growth factors, insulin-like binding protein-3, and outcome in metastatic colorectal cancer: results from intergroup trial N9741. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 24, p. 8263-8269, 2008.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell*, v. 6, n. 4, p. 313-319, 2004.

GASBARRI, A. *et al.* Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *Journal of Clinical Oncology*, v. 17, n. 11, p. 3494-3502, 1999.

GASPERI, M. *et al.* Prevalence of thyroid diseases in patients with acromegaly: results of an Italian multi-center study. *Journal of endocrinological investigation*, v. 25, n. 3, p. 240-245, 2002.

GHOSSEIN, R.A.; LEBOEUF, R.; PATEL, K.N. *et al.* Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma without extrathyroid extension: biologic behavior and clinical implications. *Thyroid*, v. 17, p.655–661, 2007.

GULLU, B. E. *et al.* Thyroid cancer is the most common cancer associated with acromegaly. *Pituitary*, v. 13, n. 3, p. 242-248, 2010.

HAY, I. D. Papillary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrine Oncology*, p. 130-142, 1990.

HAY, I. D. *et al.* Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940–1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World journal of surgery*, v. 26, n. 8, p. 879-885, 2002.

HEDINGER, C.; WILLIAMS, E.D.; SOBIN, L.H. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer*, v. 63, p. 908–10, 1989.

HILMI, C. *et al.* IGF-1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of BCL2, BCL-X(L), and survivin. *J Invest Dermatol*, v. 128, n. 6, p. 1499 -1505, 2007.

HISHINUMA, A. *et al.* Growth regulation of the human papillary thyroid cancer cell line by protein tyrosine kinase and cAMP-dependent protein kinase. *Endocrine journal*, v. 41, n. 4, p. 399, 1994.

HOU, P.; LIU, D., XING, M. Functional characterization of the T1799–1801del and A1799–1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle*, v. 6, p.377–379, 2007.

HOU, P., XING, M. Absence of germline mutations in genes within the MAPkinase pathway in familial non-medullary thyroid cancer. *Cell Cycle*, v. 5, p.2036–2039, 2006.

HUGHES, R. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, v. 83, n. 7, p. 667-676, 2001.

INOHARA, H. *et al.* Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Research*, v. 56, n. 19, p. 4530, 1996.

JAKUBIAK-WIELGANOWICZ, M. *et al.* Usefulness of galectin-3 immunohistochemistry in differential diagnosis between thyroid follicular carcinoma and follicular adenoma. *Pol J Pathol*, v. 54, n. 2, p. 111-5, 2003.

JENKINS, P. J.; BESSER, M. Clinical perspective: acromegaly and cancer: a problem. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86, n. 7, p. 2935-2941, 2001.

JIN, L. *et al.* BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagnostic Molecular Pathology*, v. 15, n. 3, p. 136, 2006.

KAWACHI, K. *et al.* Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation*. *Human pathology*, v. 31, n. 4, p. 428-433, 2000.

KEBEBEW, E. *et al.* The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of surgery*, v. 246, n. 3, p. 466, 2007.

KIM, J. *et al.* Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Annals of surgery*, v. 244, n. 5, p. 799, 2006.

KIM, T. Y. *et al.* The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*, v. 65, n. 3, p. 364-368, 2006.

KIMURA, E. T. *et al.* High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer. *Cancer Research*, v. 63, n. 7, p. 1454, 2003.

KOPEREK, O. *et al.* Immunohistochemical Detection of the BRAF V600E-mutated Protein in Papillary Thyroid Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2012.

KUMAGAI, A.; NAMBA, H.; MITSUTAKE, N. *et al.* Childhood thyroid carcinoma with RAFT1799A mutation shows unique pathological features of poor differentiation. *Oncol Rep*, v. 16, p.123–126, 2006.

KURIMOTO, M. *et al.* The prevalence of benign and malignant tumors in patients with acromegaly at a single institute. *Endocrine journal*, v. 55, n. 1, p. 67, 2008.

KURMASHEVA, R. T.; HOUGHTON, P. J. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1766, n. 1, p. 1-22, 2006.

- LAVIOLA, L.; NATALICCHIO, A.; GIORGINO, F. The IGF-I signaling pathway. *Current pharmaceutical design*, v. 13, n. 7, p. 663-669, 2007.
- LEE, J. H.; LEE, E. S.; KIM, Y. S. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid. *Cancer*, v. 110, n. 1, p. 38-46, 2007.
- LOEPER, S.; EZZAT, S. Acromegaly: re-thinking the cancer risk. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, v. 9, n. 1, p. 41-58, 2008.
- LUPI, C. *et al.* Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 92, n. 11, p. 4085-4090, 2007.
- MACCORKLE, R. A.; TAN, T. H. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell biochemistry and biophysics*, v. 43, n. 3, p. 451-461, 2005.
- MACIEL, R. M. B. *et al.* Insulin-like growth factor I in human thyroid tissue: Specific localization by immunohistochemistry and In Situ hybridization. *Endocrine pathology*, v. 6, n. 3, p. 207-215, 1995.
- MARCHISOTTI, F. G. *et al.* Acromegaly and thyroid disease: prevalence of thyroid cancer. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 49, n. 5, p. 843-849, 2005.
- MEHROTRA, P. *et al.* Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology*, v. 45, n. 5, p. 493-500, 2004.
- MELMED, S. Acromegaly. *New England Journal of Medicine*, v. 322, n. 14, p. 966-977, 1990.
- MELMED, S.; KLEINBERG, D. Anterior pituitary. In: KRONENBERG, H.M. *et al.* *Williams textbook of endocrinology*. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 8, p. 155-262.
- MELMED, S. *et al.* Diagnóstico e tratamento da acromegalia. In: VILAR, L. *Endocrinologia clínica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2009. cap. 5, p. 61-86.
- MELMED, S. Acromegaly. In: JAMENSON, J.L.; DE GROOT, L.J. *Endocrinology*. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2010. cap.14, p.262-281.
- MERCER, K. E.; PRITCHARD, C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1653, n. 1, p. 25-40, 2003.
- MORETTI, S. *et al.* Biochemical and molecular characterization of the novel BRAF(V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*, v.25, p. 4235-4240, 2004.

NAMBA, H. *et al.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 88, n. 9, p. 4393-4397, 2003.

NIKIFOROVA, M. N. *et al.* BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 88, n. 11, p. 5399-5404, 2003.

OGINO, S. *et al.* Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res.* v. 18, n. 3, p. 890-900, 2012.

OLER, G.; EBINA, K.N.; MICHALUART, JR. P. *et al.* Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clin Endocrinol (Oxf)*v. 62, p.509–511, 2005.

ONODA, N. *et al.* Autocrine role of insulin-like growth factor (IGF)-I in a human thyroid cancer cell line. *European Journal of Cancer*, v. 28, n. 11, p. 1904-1909, 1992.

ORLANDI, F. *et al.* Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Research*, v. 58, n. 14, p. 3015-3020, 1998.

ORME, S. M. *et al.* Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 83, n. 8, p. 2730-2734, 1998.

OUYANG, B. *et al.* Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 6, p. 1785-1793, 2006.

PANDINI, G. *et al.* Functional responses and *in vivo* anti-tumour activity of h7C10: A humanised monoclonal antibody with neutralising activity against the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor and insulin/IGF-1 hybrid receptors. *European Journal of Cancer*, v. 43, n. 8, p. 1318-1327, 2007.

PHIPPS, A.I. *et al.* BRAF mutation status and survival after colorectal cancer diagnosis according to patient and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 [Epub ahead of print].

RAJAGOPALAN, H. *et al.*, RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. v. 418, p. 934, 2002.

RENEHAN, A.; O'DWYER, S.; SHALET, S. Colorectal neoplasia in acromegaly: the reported increased prevalence is overestimated. *Gut*, v. 46, n. 3, p. 440-440, 2000.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G. *et al.* The oncogene BRAFV600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocrine-related cancer*, v. 13, n. 1, p. 257-269, 2006.

RUCHALA, M. *et al.* The occurrence of thyroid focal lesions and a need for fine needle aspiration biopsy in patients with acromegaly due to an increased risk of thyroid cancer. *Neuro endocrinology letters*, v. 30, n. 3, p. 382, 2009.

SANTORO, M.; MELILLO, R. M.; FUSCO, A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *European journal of endocrinology*, v. 155, n. 5, p. 645-653, 2006.

SAPIO, M.R.; POSCA, D.; TRONCONE, G. *et al.* Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol*, v.154, p.341–348, 2006.

SCHLUMBERGER, M.J.; FILETTI, S.; HAY, I.D. Nontoxic diffuse and nodular goiter and thyroid neoplasia. In: KRONENBERG, H.M. *et al.* *Williams textbook of endocrinology*. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap 13, p. 411-442.

SEBOLT-LEOPOLD, J. S.; HERRERA, R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 12, p. 937-947, 2004.

SHATTUCK, T. M. *et al.* Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 23, p. 2406-2412, 2005.

SHERMAN, S.I.; ANGELOS, P.; BALL DW *et al.* Thyroid carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw* v. 3, p.404–457, 2005.

SIEGEL, G.; TOMER, Y. Is there an association between acromegaly and thyroid carcinoma? a critical review of the literature. *Endocrine research*, v. 31, n. 1, p. 51-58, 2005.

TAKAHASHI, S. *et al.* Thyrotropin and insulin-like growth factor I regulation of tyrosine phosphorylation in FRTL-5 cells. Interaction between cAMP-dependent and growth factor-dependent signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 12, p. 7834-7841, 1991.

THAN, T. *et al.* Expression of Galectin-3 and Galectin-7 in thyroid malignancy as potential diagnostic indicators. *Singapore medical journal*, v. 49, n. 4, p. 333, 2008.

TITA, P. *et al.* High prevalence of differentiated thyroid carcinoma in acromegaly. *Clinical endocrinology*, v. 63, n. 2, p. 161-167, 2005.

TORII, S. *et al.* Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *Journal of biochemistry*, v. 136, n. 5, p. 557-561, 2004.

VIEIRA NETO, L. *et al.* Recommendations of Neuroendocrinology Department from Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism for diagnosis and treatment of acromegaly in Brazil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 55, n. 2, p. 91-105, 2011.

- WAN, P. T. C. *et al.* Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, v. 116, n. 6, p. 855-867, 2004.
- WANG, J.; KNAUF, J.A.; BASU, S. *et al.* Conditional expression of RET/PTC induces a weak oncogenic drive in thyroid PCCL3 cells and inhibits thyrotropin action at multiple levels. *Mol Endocrinol* 17:1425–1436, 2003.
- WEI, E. K. *et al.* A prospective study of C-peptide, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-1, and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 14, n. 4, p. 850-855, 2005.
- WILLIAMS, D. W.; WILLIAMS, E. D.; WYNFORD-THOMAS, D. Evidence for autocrine production of IGF-1 in human thyroid adenomas. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 61, n. 1, p. 139-143, 1989.
- WOLPIN, B. M. *et al.* Insulin, the insulin-like growth factor axis, and mortality in patients with nonmetastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 2, p. 176-185, 2009.
- XING, M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, v.12, p.245–262, 2005.
- XING, M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine reviews*, v. 28, n. 7, p. 742-762, 2007.
- XING, M. The T1799A BRAF mutation is not a germline mutation in familial nonmedullary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 63,p.263–266, 2005.
- XING, M. *et al.* BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 90, n. 12, p. 6373-6379, 2005.
- XU, X. C.; EL-NAGGAR, A. K.; LOTAN, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *The American journal of pathology*, v. 147, n. 3, p. 815, 1995.
- YASHIRO, T. *et al.* Expression of insulin-like growth factor receptors in primary human thyroid neoplasms. *Acta endocrinologica*, v. 121, n. 1, p. 112-120, 1989.
- RAJAGOPALAN, H. *et al.*, RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. v. 418, p. 934, 2002.