

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA E BIOLOGIA
CELULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA DE TUMORES BEM
DIFERENCIADOS DA TIREÓIDE POR HIBRIDIZAÇÃO
GENÔMICA COMPARATIVA EM MATRIZ (aCGH)**

DEISE CIBELE NUNES DE ALMEIDA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano
Correa de Oliveira.

Belém – Pará
Março 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NEUROCIÊNCIA E BIOLOGIA CELULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA DE TUMORES BEM
DIFERENCIADOS DA TIREÓIDE POR HIBRIDIZAÇÃO
GENÔMICA COMPARATIVA EM MATRIZ (aCGH)**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Orientador

Profa. Dra. Margarida Maria C. de Lima
Professora da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Membro

Profa. Dra. Ciane Martins de Oliveira
Professora da Faculdade Metropolitana da Amazonia (FAMAZ)
Membro

Dra Caroline Aquino Moreira Nunes
Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA)

Profa. Dra. Fernanda Andreza de P.Lott Figueiredo
Professora do Centro Universitário do Pará (CESUPA)
Membro

Se as coisas são inatingíveis...ora! Não é motivo
para não querê-las ...Que tristes os caminhos, se
não fora a presença distante das estrelas!

Mário Quintana

Dedico este trabalho à minha mãe e minha irmã, companheiras fiéis da minha jornada.

À meu esposo e minha amada filha Beatriz fontes infinitas de amor e razão da minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Prof. Dr. Edivaldo de Oliveira, por quem nutro profunda admiração, pela competência, atenção, ética, compreensão, apoio e ,acima de tudo, pela coragem e persistência em me transformar em um indivíduo melhor.

Aos colegas do laboratório, atores principais, pela paciência e dedicação desmedida, por permitirem que eu compartilhe de seus conhecimentos, sem eles nada seria possível.

A todos os professores das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários dos Hospitais Saúde da Mulher e Ofir Loiola onde as amostras foram colhidas, pela dedicação e compreensão.

Aos meus amados pacientes, que souberam compreender, cooperar e acima de tudo estimular este trabalho: eles são o verdadeiro propósito de tudo.

Aos meus queridos colegas da equipe de Cirurgia Cabeça e Pescoço, que souberam compreender e preencher minhas ausências .

Ao querido colega Michel Platini, por todo seu auxílio e dedicação.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, exemplo da busca pelo conhecimento, da perseverança , da dignidade, aquela que me mostrou que a educação é a maior riqueza.

Aos meus amados esposo e filha Beatriz, presentes em todos os momentos , luz do meu caminho e alegria da minha existência.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
I INTRODUÇÃO	1
1 ASPECTOS GERAIS	1
1.1 Tireoide	1
1.2 Doenças da Tireoide	5
2 CÂNCER	9
2.1 Aspectos Gerais	9
2.2 Citogenética e Câncer	11
2.3 Relação entre Rearranjos Cromossômicos e Genes Supressores Tumorais e Proto Oncogenes	15
3 CÂNCER DE TIREOIDE	16
3.1 Aspectos Gerais	16
3.2 Carcinoma Bem diferenciado da Tireoide e Carcinoma Folicular	20
3.3 Dados Citogenéticos e Moleculares em Câncer de Tireoide	24
4 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos Específicos	32
II MATERIAL E MÉTODOS	33
1 ASPECTOS DE ÉTICOS.....	33
2 AMOSTRAS	33

3 EXTRAÇÃO DO DNA	35
4 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM MATRIZ (aCGH)	36
4.1 Digestão Enzimática e Marcação das Amostras	36
4.2 Purificação	37
4.3 Hibridização	37
4.4 Lavagem	38
4.5 Escaneamento e Extração de Dados	39
4.6 Obtenção dos Dados	40
5 ANÁLISES	40
5.1 Levantamento das Regiões de Recorrência	40
5.2 Critério de Consideração das CNVs como Patogênicas	40
5.3 Triagem de CNVs Relevantes ao Desenvolvimento de Carcinomas Foliculares	41
5.4 Análise das Distribuições por Cromossomos de Amplificações e Deleções	41
5.5 Análise das Distribuições de Regiões de Intersecção por Cromossomo	41
III RESULTADOS	42
1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	42
2 DELEÇÕES E AMPLIFICAÇÕES	43
3 REGIÕES DE SOBREPOSIÇÃO (REGIÕES DE INTERSECÇÃO)	50
4 REGIÕES DE RELEVÂNCIA	51
IV DISCUSSÃO	52
V CONCLUSÃO	62
VI-REFERÊNCIAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH	Hibridização Genômica Comparativa em Micro Arranjos
AluI	Enzima de Restrição que Reconhece os Sítios AG-AT
APC	Polipose Adenomatose do Colon
ATC	Carcinoma Anaplásico da Tireoide
BAZ1B	Bromodomain Adjacent to Zinc
BRCA1	Câncer de Mama A1
BSA	Albumina de Soro Bovino Fetal
C8orf44	Chromosome 8 open Reading frame 44
CCND2	Cyclin D2
CCDC84	Coiled –coil domain containing 84
CFMI	Carcinoma Folicular Minimamente Invasivo
CGH	Hibridização Genômica Comparativa
CI	Carcinoma Invasivo
CNV	Variação no Número de Cópias
CXCR5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
dUTP	Difosfatase
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPC4	Deletado em Carcinoma Pancreático 4
EUA	Estados Unidos da América
FGL1	Fibrinogen like 1
FISH	Hibridização <i>in situ</i> com Fluorescência
FTC	Carcinoma Folicular da Tireoide
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GSP	General secretory pathway
FOXR1	Forkhead box R1
HER2/NEU	Fator de Crescimento Epidérmico
L-myc	Mielocitose Pulmonar
LOC100093631	General transcription factor
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
M1R4284	MicroRNA 4284
MIR3656	MicroRNA 3656
MTC	Carcinoma Medular da Tireoide
MUTS1	Mitochondrial Tumor Supressor1

NAT1 E 2	N-acetiltransferase 1 e 2
NTRK1	Receptor Tirosina Quinase Neurotrófico 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PAX8	Pareamento em Caixa do Gene 8
PCM1	Pericentriolar material 1
PDGFRL	Receptor beta-like tumor suppressor
PMS2L2	Posmeiotic segregation increased 2-like 2
PPARγ	Receptor γ de Peroxissoma Proliferador Ativado
PSD3	Pleckstrin and Sec7 domain containing 3
PTC	Carcinoma Papilífero da Tireoide
RAS	Resistance to audiogenic seizures
RB	Retinoblastoma
RET	Rearranjo Durante a Transferência
RPS25	Ribosomal protein 25
RTK	Receptor de Tirosina Quinase
SLC7A2	Solute carrier Family 7
SNORD87	Small nucleolar RNA,C/D box 87
STAG3L3	Stromal antigen 3-like 3
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TG	Tireoglobulina
TK	Tirosinoquinase
TP53	Proteína Tumoral 53
TSH	Hormônio Estimulador da Tireoide
TSHR	Receptor de TSH
TR	Receptor do Hormônio Tireoideo
UPK2	Uroplakin 2
USG	Ultrassonografia
ZNRF4	Zinc and ring finger 4
WT1	Tumor de Wilms
YWHAG	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5

RESUMO

Os tumores bem diferenciados da tireóide representam mais de 95% das neoplasias malignas da glândula. A identificação pré-operatória dos carcinomas papilíferos está bem estabelecida através dos métodos de Punção aspirativa por Agulha fina e Ultrassonografia, com quase 100% de acurácia, enquanto os tumores foliculares significam um dilema para o cirurgião, visto que os métodos existentes não conseguem determinar com eficiência o diagnóstico sendo que 60-80% dos casos operados são benignos. Dessa forma, com o intuito de se analisar alterações genômicas do tipo variações no número de cópias (CNVs) que possam diferenciar esse tumor de outros tipos de doenças da tireóide, foram analisados 13 pacientes com doença tireoidiana (3 bóciós, 2 hiperplasias, 4 adenomas foliculares e 4 carcinomas foliculares) mais 1 indivíduo sadio através do método de aCGH, para identificação de CNVs que pudessem determinar com eficiência a presença de carcinoma folicular. Os achados foram confrontados com dados de carcinomas papilífero clássico (4 pacientes) e variante folicular (2 pacientes). Foram encontradas 725 CNVs na amostra, 703 dos pacientes com patologia. Dentre estas foram selecionadas 18 regiões mais frequentes. Houve um padrão de amplificação maior em pacientes jovens com adenomas e deleção em pacientes mais velhos. Os pacientes com carcinoma apresentaram taxas de CNVs muito próximas. Os carcinomas foliculares apresentaram padrões exclusivos de alteração nos cromossomos 8 e 12. Concluimos, assim, que os carcinomas foliculares da tireóide são uma patologia com um padrão exclusivo de alterações, não havendo correlação de progressão tumoral a partir de adenomas foliculares, sendo que duas regiões -8p22 e 12p13.32-p13.33, estão presentes em 100% e 75% das amostras respectivamente, podendo ser fortes candidatos a marcadores desse tipo tumoral.

Palavras-chave : Carcinoma folicular ; aCGH ; marcador tumoral; CNVs

ABSTRACT

More than 95% of thyroid gland malignancies are well-differentiated tumors. Preoperative diagnosis accuracy for papillary carcinomas, based on FNAC (Fine Needle Aspiration Cytology) and ultrasound screenings, has become nearly 100%. Nevertheless, when follicular neoplasm diagnosis is concerned, this reality is quite different. Using current preoperative screening tools, 60 – 80% of patients suspected to present follicular thyroid cancer, when operated turn out to suffer from benign disease. Therefore, in an effort to improve these results, genomic analysis of Copy Number Variations (CNV) that may more precisely differentiate follicular tumor from other thyroid conditions were carried out in 13 patients (3 bearing goiters, 2 hyperplasias, 4 follicular adenomas, 4 follicular carcinomas, 1 healthy individual). CNVs were tracked through aCGH method in order to detect follicular carcinoma most accurately. Results were compared with classic papillary carcinoma (4 subjects) and follicular variant (2 subjects). Samples demonstrated 725 CNVs, 703 of which belonging to patients with disease. Among these, 18 most frequent regions were selected. Patterns of amplification were more frequent in younger patients, while deletions were more frequent in the elder ones. Carcinoma patients presented very close CNV rates. Also, exclusive patterns of chromosomes 8 and 12 alterations were noticed in follicular carcinoma. Thus, it is possible to conclude that thyroid follicular carcinoma is a condition comprehending exclusive patterns of alterations, and progression of this disease is not related to follicular adenomas. Finally, regions -8p22 and 12p13.32-p12.33 were detected in 100% and 75% of samples respectively, therefore, may be deemed as possible tumoral markers.

Key Words: Follicular Neoplasm; aCGH; tumoral markers; CNVs.

I.INTRODUÇÃO

I.1. ASPECTOS GERAIS

I.1.1Tireoide

A tireoide é uma glândula endócrina bilobulada localizada na região anterior do pescoço. É a maior glândula endócrina do corpo, com um peso de 15 a 20 gramas em indivíduos normais e com uma grande capacidade de crescimento, sendo responsável pela produção dos hormônios tireoideanos (T3 e T4), envolvidos com diversos componentes da homeostase (função cerebral, cardiovascular, intestinal, metabolismo celular, produção de calor, etc). A palavra tireoide vem do grego sendo a junção dos termos *thyreós* (escudo) e *oidés* (forma de). A descoberta da tireoide ocorreu em 1656, por Thomas Warton, que realizava uma pesquisa sobre glândulas. Na época, ele acreditava que a função da tireoide fosse apenas estética, servindo simplesmente para modelar o pescoço. Somente no século XIX, foi possível confirmar sua importância (Bianco e Kimura , 1999; Caria e Vanni, 2010).

Anatomicamente tem origem na linha média do assoalho da faringe primitiva e também bilateralmente aos tecidos da 4^a bolsa branquial, lateralmente. Ela é formada pelos lobos direito e esquerdo, que são posicionados ântero lateralmente à laringe e à traquéia. Os dois lobos são unidos abaixo da cartilagem cricóide pelo istmo que mede cerca de 12 a 15 mm. Ocasionalmente, o lobo piramidal está localizado na linha média, superior ao istmo e representa o remanescente do ducto tireoglosso, pela descida da glândula tireoide primitiva da base da língua até sua localização definitiva no pescoço durante o processo de desenvolvimento embriológico , representado pela Figura 1(Bianco e Kimura, 1999; Caria e Vanni,2010).

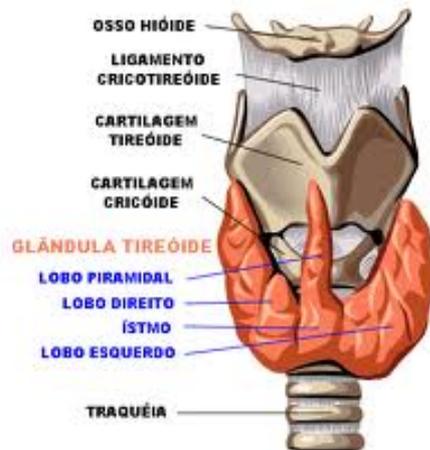


Figura 1-Posição anômica da glândula tireoide. (Fonte:www.medscanbh.com.br).

Embriologicamente a glândula tireoide é derivada a partir de duas linhas de células predominantes (endoderme e as células da crista neural). A endoderme começa na região da cabeça e migra para o local da tireoide. Essas células proliferam e se tornam células foliculares. As células da crista neural combinam com as bolsas do 4º e 5º arcos branquiais e formam as células C parafoliculares e as paratireoides. O tecido tireoidiano é, portanto, constituído pelas células foliculares – o tireócito, que representa 2/3 das células, encarregado de captar o iodo da circulação sanguínea para sintetizar os hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4). Intercaladas entre elas encontram-se as células parafoliculares (também conhecidas como células claras ou células C), que secretam o hormônio calcitonina, encarregado de controlar o metabolismo do cálcio através da manutenção do seu nível sanguíneo, representado na Figura 2 (Pierotti *et al.*, 1996).

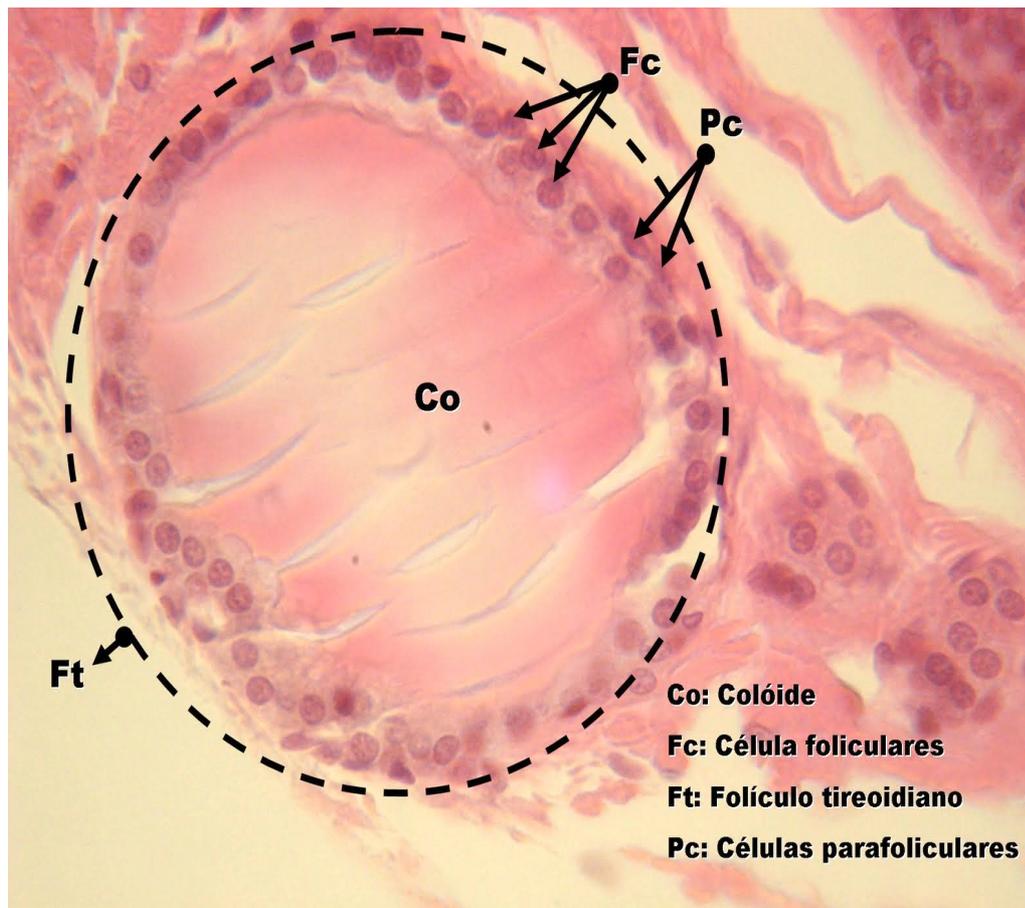


Figura 2- Aspecto histológico da tireoide (Fonte:histologiaufgd.blogspot.com.br).

Os hormônios tireoidianos atuam mediante sua união a um receptor do Hormônio Tireóideo (TR), deste modo estimulam processos vitais em todo organismo, intervindo na maturação e desenvolvimento dos tecidos, na produção de energia e calor, no metabolismo de nutrientes e nas funções mentais, cardíacas, respiratórias, sexuais e reprodutoras. A glândula tireoide funciona de forma semelhante ao restante das glândulas endócrinas, através do eixo hipotalâmico hipofisário tireoidiano, dentro do conceito de *feedback* negativo. A principal função da glândula é a produção de hormônios T3 e T4. Esta produção é feita após estimulação dos tireócitos pelo Hormônio Estimulador da Tireoide (TSH) liberado pela hipófise. A tireoide é a única glândula endócrina que armazena o seu produto de excreção (Bianco e Kimura ,1999;Matsuo *et al.*, 2003).

A síntese dos hormônios da tireoide, biodisponibilizados em duas formas - T4 e T3, requer a captação do iodo proveniente da dieta e sua posterior união ao aminoácido tirosina, proporcionado pela proteína Tiroglobulina (TG) (Gil 2006; Meyer ,2007).

O TSH determina a taxa de secreção de T3 e T4 e estimula o crescimento e divisão das células foliculares. O hipotálamo libera hormônio liberador de tireotropina (TRH), que faz com que libere na região anterior da hipófise o TSH. Por sua vez, permite que o TSH liberte a tiroxina pela tireoide, T4 e T3. Periféricamente, T4 é convertido em T3, que é mais ativo (Figura 3). A regulação na secreção de T3 e T4 é realizada tanto pelo estresse quanto pelo frio fazendo aumentar a taxa do metabolismo basal. (Bianco e Kimura ,1999;Gil, 2006).

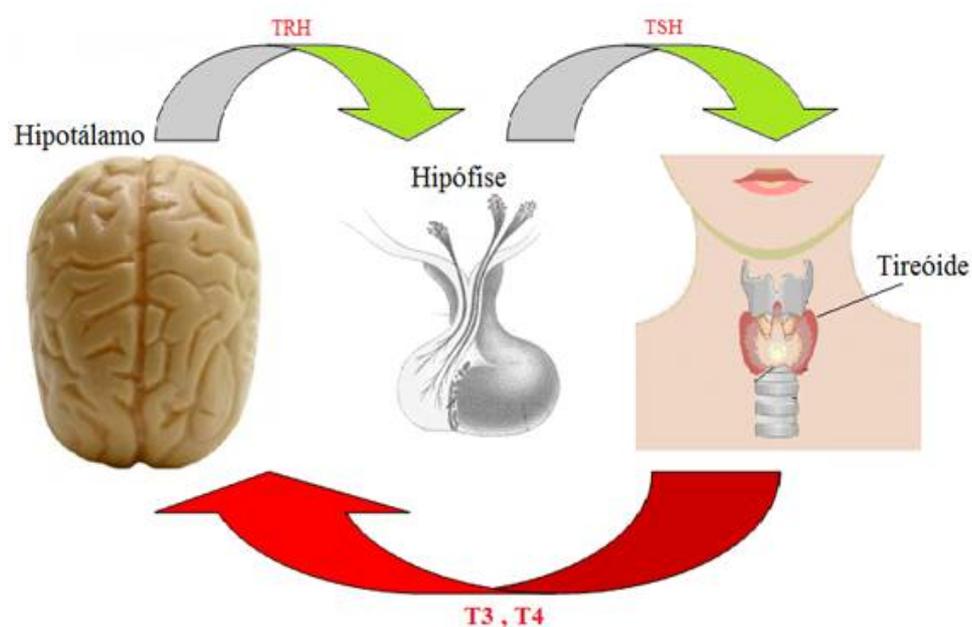


Figura 3- Esquema de retroalimentação negativa da tireoide (Fonte:www.enfermeiropsf.blogspot.com.br).

I.1.2. Doenças da Tireoide

As patologias que acometem a glândula tireoide podem provocar alterações funcionais ou anatômicas. Nas alterações que comprometam sua função, haverá o aumento ou a diminuição da produção do hormônio tireoidiano – hiper ou hipotireoidismo, respectivamente.

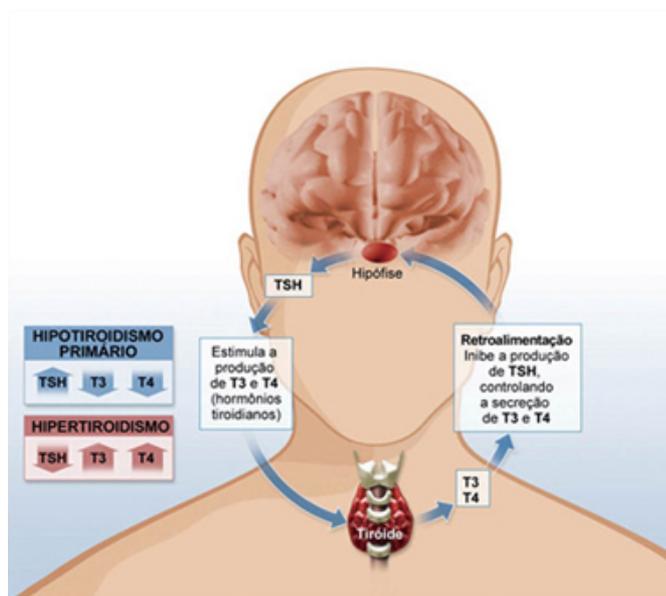


Figura 4 - Alterações hormonais da tireoide (Fonte: www.estimulacaoneurologica.com.br).

As patologias que causam mudança no ritmo da síntese hormonal podem ser agudas ou crônicas, provocadas por fatores intrínsecos (doenças autoimunes como Hashimoto, Graves, Plummer) ou extrínsecas (dieta, radiação). Nestes casos, o paciente pode apresentar sintomas clínicos descritos nas síndromes de hipotireoidismo e hipertireoidismo, como também pode não apresentá-los, sendo classificados como alterações subclínicas (sintomatologia leve e/ou discreta) ou até mesmo assintomáticos (Gil, 2006).

As patologias causadoras de mudança na forma da tireoide provocam o seu aumento, denominado de bócio, que pode ser difuso, levando ao aumento de todo

tecido tireoidiano homoganeamente, ou nodular, provocando a aparição de nódulos e/ou cistos em um crescimento heterogêneo do tecido glandular através de lesões únicas ou múltiplas; a hiperplasia da glândula é a resposta ao estímulo para produção hormonal levando ao aumento glandular (Pierotti *et al.*, 1996). O ritmo de crescimento da glândula nestes casos é extremamente lento, levando muitas vezes mais de 20, 40 anos para atingir volumes que venham a causar sintomatologia, já que devido a esse aumento lento e indolente, há uma acomodação regional e mesmo a compressão causada em órgãos vizinhos, como traquéia e faringe, é pouco perceptível pelo doente, ocasionando um atraso no diagnóstico da patologia (Criado *et al.*, 1995). É possível que um mesmo indivíduo apresente alterações funcionais e de forma simultaneamente (Bianco e Kimura, 1999). Estas enfermidades predominam no sexo feminino, numa proporção de 4 mulheres para 1 homem, entre a 4^a e 6^a décadas de vida, não se sabendo quais os fatores relacionados a esta predominância de gênero (Gerhard *et al.*, 2010).

O surgimento de nódulos dentro do tecido tireoidiano indica a necessidade de investigação. Nas últimas décadas, devido ao incremento dos métodos diagnósticos por imagem, a incidência de nódulos tireoidianos detectados por ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética da região cervical, provocou o aumento estatístico significativo na incidência das patologias tireoidianas. Existem relatos de que a realização aleatória de exame de imagem da tireoide na população em geral evidenciaria nódulos da tireoide em 40% dos indivíduos examinados (Matsuo *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2006; Caria e Vanni, 2010).

Os nódulos tireoideanos são uma patologia frequente na população geral. A estatística mundial estima sua presença entre 3,2 a 4,2%, se pesquisado por palpação manual do pescoço por profissional médico experiente, e 27 a 67% se for

considerado o diagnóstico realizado através de técnicas de imagem como a ultrassonografia (Pineda *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que a maioria dos nódulos tireoidianos é de natureza benigna e apenas uma pequena porcentagem deles corresponde a tumores malignos (5 a 15%) (Bertram, 2000). De qualquer forma, todo nódulo tireoidiano deve ser investigado para se descartar as formas neoplásicas. A apresentação clássica do câncer de tireoide é um nódulo cervical (Moyano *et al.*, 2004).

O câncer da tireoide é o tipo de tumor maligno endócrino mais comum (98%) , mas representa apenas 1% de todos os tipos de câncer, sendo o oitavo mais frequente em mulheres. A proporção é de 3 mulheres para cada homem, predominantemente entre os 35 e 50 anos, e também não há estudos que determinem a causa desta proporção. Sabe-se também, através de evidências estatísticas, que um indivíduo do sexo masculino que apresente clinicamente, ou ao exame de imagem, nódulo de tireoide, tem 50% de chance de ter neoplasia maligna (Gerhard *et al.*, 2010).

Assim, todo paciente submetido a exame de imagem da tireoide que evidencie formações nodulares em seu tecido é encaminhado para investigação da patologia que possa ter promovido tal alteração. As sociedades médicas responsáveis pelo tratamento de tais enfermidades têm lançado mão de protocolos que são estabelecidos através de estudos estatísticos e da observação clínica de pacientes doentes e tratados, visando padronizar a abordagem e o tratamento (Chagas *et al.* 2008).

O exame padrão ouro para diagnóstico de nódulos tireoidianos é a PAAF. Este exame consiste na coleta através de punção guiada por exame de imagem, do nódulo ou dos nódulos tireoidianos alterados (aqueles que apresentam formação sólida em seu interior)(Figura 5). Este material é colocado sob lâmina e examinado através de microscopia, para identificação de características citológicas que

confirmem o diagnóstico. Este valioso recurso apresenta uma eficácia de 90% no diagnóstico das patologias tireoidianas (Alvi *et al.*, 2009).



Figura 5 - Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) guiada por USG. (Fonte: www.endocardio.med.br).

Para aqueles pacientes que ao exame de punção forem diagnosticados como maligno e ou suspeito de malignidade (proliferativo celular, folicular, hipercelular), é indicado o tratamento cirúrgico com ressecção total da glândula tireoide(Ward *et al.*,2006; Chagas *et al.*, 2008). As causas dos nódulos da tireoide tem sido amplamente estudadas e debatidas. Os fatores mais claramente relacionados com a formação de nódulos são a carência de Iodo na dieta e o hipotireoidismo (elevação do TSH). Há, sem dúvida, uma maior predisposição de se desenvolver nódulos

tireoidianos com o aumento da idade. Alguns estudos mostram que o consumo de Iodo em excesso leva ao aparecimento do bócio, assim como a gravidez aumenta as chances de aparecimento de nódulos (Maciel *et al.*, 2005).

A alta prevalência de nódulos tireóideos, sua baixa frequência de malignidade, e considerando a morbidade e custos associados a tireoidectomia, torna indispensável a adição de técnicas de diagnóstico diferencial que possuam altos valores de sensibilidade e especificidade para detectar lesões benignas e malignas e, assim realizar um tratamento adequado em cada caso (Pineda *et al.*, 2003).

I.2 CANCÊR

I.2.1 Aspectos Gerais

O termo câncer refere-se a uma variedade de patologias nas quais crescimento e proliferação celular estão desregulados, levando à formação de uma massa tumoral que pode ser capaz de invadir e destruir tecidos vizinhos, disseminar-se para outros órgãos do corpo por metástases. Embora fatores ambientais e dietéticos contribuam para sua gênese, o câncer resulta de mudanças genéticas múltiplas em uma população de células, as quais o tornam a doença genética mais frequente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Kleihues *et al.*, 2002), mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer todos os anos, sendo esta doença responsável por 12,5% das mortes anuais no mundo. Considerando que o total de tumores passíveis de prevenção pode alcançar mais de 50% de todos os casos em países desenvolvidos e reconhecendo a importância da citogenética e da biologia molecular no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer, vários estudos dessa natureza

têm sido realizados visando a prevenção, detecção precoce e tratamento dessas doenças malignas (Cai *et al.*, 2000).

O câncer é uma doença genética multifatorial, na qual a célula perde o controle sobre o seu ciclo celular, e passa a multiplicar-se descontroladamente. Esta doença é ocasionada, pelo acúmulo de mutações em genes importantes em muitas vias de controle positivo ou negativo do ciclo (*gatekeepers*), ou em genes que atuam na manutenção da integridade do genoma celular (*caretakers*). Estas mutações podem ocorrer de diversas maneiras, podem ser mutações na dupla fita de DNA, padrões epigenéticos de metilação e acetilação, alterações na expressão gênica produção de mRNA com erro de *splicing*, mRNAs degradados precocemente, proteínas não funcionais, etc. Por tais motivos, são incontáveis as técnicas que estudam tais alterações e que procuram entender os mecanismos pelos quais se formam e desenvolvem os tecidos neoplásicos (Maciel *et al.*, 2005) .

A instabilidade do genoma tem sido considerada como importante fator na formação e progressão da neoplasia. No curso da carcinogênese, as células experimentam várias alterações genéticas (incluindo ganhos e deleções de genes e cromossomos) que estão associadas com a transição de uma lesão pré-neoplásica a um tumor invasivo e daí sua metástase. Uma alta frequência de deleções cromossômicas relacionadas com perda de heterozigose, é considerada um marco em instabilidade genômica em câncer, hoje alvo de estudos através de várias ferramentas de citogenética molecular (Qin, 2002).

A célula deve sofrer uma ou mais alterações no seu genoma, usualmente na forma de mutações nos genes envolvidos no controle do ciclo celular, o que leva a um relaxamento dos mecanismos de controle do crescimento e divisão (Ward *et al.*, 2006). Células nas quais os mecanismos de controle foram alterados têm maior

chance de desenvolver novas anormalidades genéticas, isto é, se tornam instáveis (Breivik, 2005). Quando a célula sofre grandes danos, que sobrepujam a sua capacidade de reparação, se torna sujeita a sofrer alterações cromossômicas, como translocações, deleções, ampliações, duplicações ou inversões de genes. Inserções, deleções, duplicações e inversões, geralmente resultam na produção de produtos gênicos truncados ou encurtados, enquanto que as trocas de bases alteram a sequência de aminoácidos do produto gênico ou também resultam em produto truncado. Mutações externas à região codificadora podem afetar a transcrição, a tradução e o *splicing* do RNA mensageiro e seu processamento.

Assim, existe uma relação entre o agente causador deste dano e o grau de heterogeneidade do clone celular que se desenvolverá, o que, por sua vez, guarda estreita relação com a capacidade de algumas destas células adquirirem resistência terapêutica e, portanto, definirão pior prognóstico ao tumor. Muitos genes supressores tumorais foram identificados a partir da análise de mutações cromossômicas, como o *TP53*, *APC*, *DPC4* e o *P16*, envolvidos no processo carcinogênico em diversos tecidos (Ouyang *et al.*, 2002).

I.2.2 Citogenética e Câncer

Os avanços na compreensão da leucemogênese foram solidamente sustentados pelo desenvolvimento metodológico na área de citogenética. Anormalidades cromossômicas específicas não aleatórias frequentemente associadas com tipos de doenças hematológicas, desempenham um papel importante no seu diagnóstico e foram demonstrados como indicadores de prognóstico independentes. Vias

moleculares alteradas por proteínas quiméricas ou desreguladas como consequência de anormalidades cromossômicas, também têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de terapias específicas e ensaios citogenéticos são importantes para a seleção de pacientes na avaliação dos resultados do tratamento e acompanhamento. Nos tumores sólidos, altos níveis de significativas anomalias cromossômicas foram detectados, mas distinção entre a validade e eventos irrelevantes tem sido um grande desafio (Mitelman, 2000). Por conseguinte, a aplicação de tecnologia citogenética como ferramenta de diagnóstico, prognóstico ou terapêutica para essas malignidades ainda é muito subvalorizado.

O surgimento das técnicas de base molecular, tais como a análise de banda de alta resolução e a Hibridização *In Situ* com Fluorescência (FISH) trouxe um mecanismo tecnológico de grande valia aumentando a possibilidade de identificação de alterações genômicas. O aprimoramento tecnológico da hibridização *in situ* deu origem à multiplex FISH e à Hibridização Genômica Comparativa (*Comparative Genomic Hybridization-CGH*), e mais recentemente ao *a-CGH*, idealizadas para realizar análises rápidas e precisas do genoma completo de tumores, em experimentos únicos (Patel *et al.*, 2000; Pinkel e Albertson, 2005a).

Os métodos de citogenética molecular são necessários para detectar defeitos submicroscópicos, como microdeleções e microduplicações (Patel *et al.*, 2000; Pinkel e Albertson, 2005a). A aplicação de FISH em células interfásicas (iFISH) permite análise do aumento ou diminuição do número de cromossomos, através do uso de sondas centroméricas ou sondas controle de cópia única, e pode evidenciar alterações cromossômicas presentes em uma pequena porcentagem de células que poderiam escapar da detecção, caso somente técnicas de bandeamento fossem utilizadas (Tibiletti, 2004).

A descoberta das técnicas citogenéticas foram particularmente úteis para tumores sólidos, e o espectro da sua aplicação está se expandindo rapidamente para melhorar a eficiência e sensibilidade na prevenção do câncer (Varella-Garcia, 2003). A instabilidade cromossômica é uma característica comum das células cancerígenas. Muitos mecanismos celulares levam à instabilidade cromossômica, envolvendo rearranjos numéricos e estruturais nessas células, incluindo problemas de segregação, de pontos de checagem do ciclo, de estabilidade telomérica e de reparo de DNA. O número de diferentes mecanismos relacionados à instabilidade cromossômica vem aumentando rapidamente com novas descobertas. Considerando-se que a instabilidade cromossômica é uma das maiores causas de resistência de tumores a certos tratamentos, o entendimento dos mecanismos que levam à essa instabilidade tem uma grande importância prática (Gollin, 2005). Estima-se que desequilíbrios no número de cromossomos seja a modificação genética mais comumente encontrada nos tumores sólidos já analisados (Mitelman *et al.*, 1997a).

As aberrações cromossômicas numéricas são comumente observadas em câncer humano. Três linhas de evidência levam a crer que essas aneuploidias são eventos discretos de mutações cromossômicas que contribuem para o processo de transformação maligna: primeiro, a análise de aneuploidias por técnicas de citogenética molecular revelaram que aneuploidias cromossômicas específicas são relacionadas com tipos tumorais distintos; segundo, linhagens de células tumorais aneuplóides apresentaram uma elevada taxa de instabilidade cromossômica; e terceiro e mais importante, vários genes que controlam a segregação cromossômica foram encontrados mutados em células tumorais humanas, associando essas mutações à indução de aneuploidias em tumores (Goodison *et al.*, 2005). Há um aumento crescente de estudos de anormalidades cromossômicas em humanos, principalmente

por estarem relacionadas etiologicamente a neoplasias, envolvendo oncogenes e genes supressores de tumor, como produtos da instabilidade genética (French *et al.*, 2003).

Uma divisão desigual dos cromossomos origina as aneuploidias. As aneuploidias (perdas ou ganho de um ou mais cromossomos) vêm sendo observadas em vários tipos diferentes de neoplasias e, apesar disso, não se sabe exatamente seu papel na carcinogênese (Dey, 2004) . Como esses rearranjos numéricos são consistentemente observados em todos os cânceres, muitos trabalhos apoiam a hipótese de que as aneuploidias são frequentemente causadas por um tipo particular de instabilidade genética, chamada instabilidade cromossômica, a qual pode refletir defeitos na segregação mitótica (Rajagopalan e Lengauer, 2004).

Um princípio fundamental na compreensão de tumorigênese é que o câncer surge a partir das aquisições sequenciais de alterações cromossômicas em genes específicos (Gerhard *et al.*, 2010). Estas mudanças (mutações e amplificações) ocorrem em células individuais, e cada mudança atinge uma onda de expansão clonal, sendo necessários de 6 a 10 eventos clonais para se atingir maturação neoplásica. Ao contrário das células normais, que contém um número regular de 46 cromossomos, as células neoplásicas frequentemente apresentam um número maior de cromossomos, cerca de 60 a 90, e podem diferir em número e estruturas em células de um mesmo tumor (Hanahan e Weinberg, 2000).

As bases genéticas de todo processo de aneuploidias precisam de mais investigações. Entretanto, tetraploidizações vistas em lesões pré-neoplásicas como o esôfago de Barret e colite ulcerativa; translocações balanceadas e telômeros curtos vistos em células telomerase negativas imortalizadas; e anormalidades em números (dobrados) de centrômeros e mutações em genes responsáveis por pontos de

checagem de fusos mitóticos podem ser as bases genéticas para as aneuploidias ou instabilidades cromossômicas (Dey, 2004; Kato e Fahey, 2009).

I.2.3 Relação entre Rearranjos Cromossômicos e Genes Supressores Tumorais e Proto oncogenes

As modificações cromossômicas que atuam na tumorigênese são diretamente relacionadas com muitos proto oncogenes, genes supressores tumorais e outros genes de controle de ciclo celular (Perissel *et al.*, 2000; Gunter, 2001). No caso de deleções, o funcionamento normal desses genes e dos mecanismos que eles controlam sofrem modificações devido a uma haplo insuficiência ou desequilíbrio da expressão gênica; por essa via pode-se ativar os mecanismos iniciais da gênese tumoral. Os exemplos incluem a deleção intersticial de 11p13, que contém o gene supressor de tumor *WT1*, no tumor de Wilms; a deleção da banda 13q14, na qual se localiza o gene *RB*, responsável pelo retinoblastoma em crianças; e a deleção do 17p13, onde encontra-se o gene *TP53*, relacionado com os carcinomas gástrico, de mama, melanoma, de pulmão, de ovário e de cólon (Bertram, 2000; Mitelman, 2000; Gunter, 2001).

O gene *TP53* está bem reconhecido como guardião do genoma humano: é importante notar que as deleções que comprometem os *locis* dos genes *TP53* e do *RB* desencadeiam o surgimento de diferentes tipos de tumores em mais de 50% dos casos (Hollstein *et al.*, 1991; Sandberg, 1994; Lopez *et al.*, 2008). Por outro lado, as translocações podem conduzir à transativação gênica anormal desses genes, como ocorre com o *L-myc* (1p32) em carcinoma de pulmão, o *N-ras* (1p11) em neuroblastomas, *APC* (5q21) em polipose de cólon, *BRC1* (1p36 e17q21) em câncer de mama e de ovário, e a super-expressão do oncogene *HER2/NEU* em carcinoma de

mama (Rabbitts, 1994; Mitelman *et al.*, 1997b; Schwab, 1999; Obara *et al.*, 2001). As translocações também afetam a estrutura e função de outros genes, como aqueles que codificam fatores de crescimento (Shackney e Shankey, 1997). Da mesma forma, esse tipo de rearranjo pode originar genes híbridos (genes fusionados) cujos produtos, proteínas quiméricas, aumentam notoriamente a proliferação celular e ativam mecanismos de gênese tumoral e posterior metástase (Aman, 1999; Mitelman, 2000). Conclui-se, dessa forma, que quaisquer modificações no número ou estrutura dos cromossomos humanos que comprometam os *loci* de proto oncogenes e genes supressores tumorais ativam os mecanismos de surgimento de neoplasias em humanos.

I.3 CÂNCER DE TIREÓIDE

I.3.1 Aspectos Gerais

A patologia nomeada como câncer de cabeça e pescoço compila uma extensa lista de tumores que acometem tecidos da região topográfica da cabeça e do pescoço, que compreendem o trato aerodigestivo superior (que inclui a boca, faringe, cavidade nasal, nasofaringe, seios paranasais e laringe), seu arcabouço ósseo e dentário, assim como órgãos dos sentidos (olhos e região orbitária e ouvidos), glândulas salivares e glândula tireóide (Guimaraes *et al.*, 2009).

Os carcinomas de cabeça e pescoço representam o sexto câncer mais frequente no mundo inteiro. O tipo histológico mais frequente dentro deste grupo de patologias são os que se originam no epitélio escamoso, e no mínimo 90% dos cânceres de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas. Para estes

tumores, a frequência de pacientes com sobrevida média de cinco anos está entre os menores de todos os tipos (Bockmuhl *et al.*, 1998).

Dois fatores têm papel importante na formação de tumores no epitélio escamoso que reveste as cavidades. O principal é o fumo, que aumenta a incidência de aparecimento dos tumores de cabeça e pescoço assim como os tumores de pulmão. E em seguida, a ingestão de álcool também é relacionada com o aumento da incidência de tumores nesta região (Guimaraes *et al.*, 2009).

O câncer de tireoide não é um câncer comum, representa 1 a 2% de todos os cânceres. Todavia, é o tipo de câncer endócrino mais frequente e é um dos poucos tipos de câncer que tem aumentado sua incidência com o tempo. Em parte, este fenômeno é explicado pelo aumento do diagnóstico precoce através de exames de tireoide por outros motivos (Bertram, 2000).

Estima-se que 18 em cada 100.000 mulheres desenvolvem câncer de tireoide no Brasil anualmente. A proporção de incidência entre homens e mulheres é 1:3 (Gerhard *et al.*, 2010). A típica apresentação deste tipo de câncer é paciente do sexo feminino de 30 a 50 anos com um nódulo palpável cervical que representa um nódulo tireoidiano ou um linfonodo cervical. Quando o diagnóstico é feito, os nódulos tireoidianos são habitualmente de 1 a 4 centímetros e apresentam metástases linfonodais em um terço, mas raras vezes metástases a distância são encontradas. É pouco frequente o câncer de tireóide causar rouquidão ao ser descoberto (Ward *et al.*, 2006).

Classificam-se histologicamente em tumores derivados das células foliculares (carcinomas papilífero, folicular e anaplásico) e das células C ou parafoliculares (carcinoma medular) da tireóide (Tabela 1). O Carcinoma Papilífero da Tireoide (PTC, do inglês *papillary thyroid carcinoma*) é o mais frequente,

abrangendo aproximadamente 80% dos casos, seguindo-se do Carcinoma Folicular da Tireoide (FTC, do inglês *follicular thyroid carcinoma*) com 15% dos casos, do Carcinoma Medular da Tireoide (MTC, do inglês *medullary thyroid carcinoma*) com 3% dos casos e do Carcinoma Anaplásico da Tireoide (ATC, do inglês *anaplastic thyroid carcinoma*) com 2% dos casos (Maciel *et al.*, 2005; Woodruff *et al.*, 2010).

TABELA 1: Incidência dos tumores da tireoide em porcentagem.

Derivação Celular	Folicular			Parafolicular
Tipo Histológico	Papilífero	Folicular	Anaplásico	Medular
Incidência	80%	15%	2%	3%

Basicamente, o tratamento é cirúrgico e consiste em realizar a tireoidectomia total. A cirurgia retira a glândula tireoide e resseca gânglios linfáticos adjacentes acometidos pelo tumor, o que se chama de esvaziamento cervical. Apresenta índices de complicações entre 0,2 a 6,9% dos casos, dependendo da extensão da ressecção e da experiência da equipe cirúrgica (Pineda *et al.*, 2003). No pós-operatório faz-se a supressão hormonal, que consiste em repor o hormônio tireoidiano com uma dose 2-3 vezes superior a necessária, no intuito de diminuir a produção pela hipófise do TSH, suprimindo sua produção, um hormônio que estimula o crescimento do câncer de tireoide. O objetivo é deixar os níveis de TSH em um valor inferior ao nível normal quase imperceptível (Maciel *et al.*, 2005).

Cânceres de tireoide em estágios iniciais tem chance de cura maior que 90%. Diversos estudos revelam que pacientes submetidos a tratamento de câncer bem

diferenciado de tireoide têm até 95% de chance de estar vivos após 20 anos. Os pacientes que não apresentam boa evolução normalmente recorrem precocemente. Pacientes com metástases cervicais não tem uma chance maior de morrer pela doença (Ward *et al.*, 2006).

Os fatores que influenciam negativamente na evolução do câncer bem diferenciado de tireoide são: pacientes com mais de 45 anos; tumores maiores que 4 cm; presença de metástases a distância; presença de tumor que invade as estruturas adjacentes e não é totalmente ressecado; alguns tipos mais agressivos de tumor (Matsuo *et al.*, 2003).

Até um terço dos cânceres bem diferenciados de tireoide recidivam e retornam principalmente em gânglios (linfonodos) cervicais. Podem se passar até 20 anos para o câncer de tireoide reaparecer, por isso é necessário seu seguimento em longo prazo. O paciente com câncer da tireoide não deve ter alta, já que recidivas ainda podem ocorrer décadas após um tratamento aparentemente bem sucedido (Ward *et al.*, 2006). Este seguimento envolve o exame físico cervical e exames laboratoriais como a dosagem de tireoglobulina (marcador tumoral), TSH, USG cervical, cintilografia de corpo inteiro, raio X e ressonância magnética (Ward *et al.*, 2006).

O câncer de tireoide pode ser fatal e normalmente acontece quando os fatores negativos citados ocorrem. Aproximadamente 5 a 10% dos casos de câncer de tireoide tem história semelhante na família, no entanto não existem estudos que demonstrem ou evidenciem uma alteração genética hereditária (Robenshtok *et al.*, 2011).

A principal associação de câncer de tireoide está em pacientes que receberam radiação em sua tireoide. Anos após o desastre de Chernobyl e a bomba de Hiroshima houve uma incidência muito aumentada de câncer de tireoide, principalmente em crianças (Zitzlsberger *et al.*, 2011).

A evolução das técnicas de diagnóstico e de sua interpretação reduziu o número de cirurgias realizadas desnecessariamente em tumores benignos, no entanto, estes diagnósticos ainda geram uns 20% de amostras consideradas indeterminadas quanto a sua malignidade. Desta forma, marcadores moleculares (genéticos, citogenéticos ou imunocitoquímicos) que auxiliem a identificação destas amostras em benignas ou malignas, reduzirão ainda mais o número de cirurgias realizadas desnecessariamente (Miura *et al.*, 2003; Kato e Fahey, 2009).

I.3.2 Carcinoma Bem Diferenciado da Tireoide e Carcinoma Folicular

Apesar da sua simples organização, a glândula tireoide pode dar origem a um amplo espectro de neoplasias, desde inócuas até lesões altamente malignas. Aproximadamente 94% dos tumores malignos são representados por carcinoma bem diferenciado da tireoide formados por células de origem folicular. Estas neoplasias são divididas em duas categorias principais: carcinoma papilífero e carcinoma folicular da tireoide. Apesar de sua origem no mesmo tipo de célula, as duas neoplasias mostram comportamento biológico diferente e conjuntos distintos de características genéticas, incluindo padrões específicos de citogenética (Castro *et al.*, 2005). O adenoma da tireoide é a contraparte benigna do carcinoma folicular. Não há contrapartida benigna do carcinoma papilífero identificada.

De acordo com achados clínicos e critérios morfológicos (histológicos) bem estabelecidos, os carcinomas tireoidianos derivados do epitélio folicular podem ser classificados como carcinomas bem diferenciados (incluem os carcinomas papilífero e folicular), pouco diferenciados e indiferenciados (ou anaplásicos). Evidências clínico-patológicas sugerem uma progressão tumoral do câncer de tireoide a partir de um

carcinoma bem diferenciado e, finalmente, evoluindo para uma forma clinicamente mais agressiva e histologicamente menos diferenciada, isto é, o carcinoma indiferenciado da tireoide. Alterações moleculares distintas ou prevalentes em um ou outro destes tumores também suportam o modelo de progressão tumoral no câncer de tireoide (Bertram, 2000).

O carcinoma papilífero da tireoide é a neoplasia maligna mais comum da glândula tireoide e corresponde a cerca de 90% dos casos. Este tumor é constituído por células foliculares bem diferenciadas que apresentam alterações nucleares típicas (fendas e pseudo-inclusões nucleares, cromatina em “vidro fosco” e irregularidade da membrana nuclear), bem como padrões arquitetônicos variados como a formação de papilas (padrão clássico, o mais comum) ou folículos (variante folicular) ou ainda, aspectos citológicos diversos como a presença de células oncocíticas (variante oncocítica) ou de células altas (variante de células altas). Os microcarcinomas papilíferos são tumores menores de 1,0 cm na sua maior dimensão, geralmente são ocultos e podem ser encontrados em até 30% das glândulas tireoides examinadas em necrópsias. A maioria dos carcinomas papilíferos ocorre em adultos entre 20 e 50 anos de idade, sendo mais comuns em mulheres (Gerhard *et al.*, 2010). O diagnóstico de carcinoma papilífero tem critérios histológicos e citológicos característicos, que estabelecem sua identidade com valores preditivos positivos que se aproximam de 100%, em citologia, biópsia por agulha fina e tipo histológico posterior, sem dificuldades (Moyano *et al.* 2004).

O carcinoma folicular de tireoide representa 10-25% dos tumores malignos desta glândula, dependendo da população estudada. Os tumores da tireoide aumentam a sua frequência em regiões com carência de iodo. Devido a sua baixa incidência e evolução relativamente benigna e arrastada, estudos prospectivos randomizados são

praticamente impossíveis de ser feitos. Ao contrário do que ocorre com o carcinoma papilífero, existem poucos estudos na literatura abordando diagnóstico, tratamento e evolução do carcinoma folicular da tireoide. Este tipo de neoplasia ocorre em pacientes de faixa etária mais avançada e costuma ser mais agressivo que o carcinoma papilífero (Alvi et al,2009).

Estes tumores são geralmente apresentados como nódulos solitários em pacientes de meia-idade e idosos. No entanto, pode surgir em qualquer idade e predominam nas mulheres. Os critérios diagnósticos para casos de carcinomas foliculares definidos pela Organização Mundial de Saúde são: 1. Extensão neoplásica para o parênquima adjacente, 2. Invasão dos vasos sanguíneos dentro e fora da cápsula e 3. invasão capsular. Este último critério é controverso, uma vez que existem discrepâncias entre considerar a invasão, quando as células cancerígenas se espalham dentro da cápsula, e não a ultrapassam completamente, ou se a considerar a invasão somente quando a cápsula é totalmente transgredida pelas células neoplásicas. Daí os FTC foram classificadas em dois grupos principais: carcinoma minimamente invasivo (CFMI) e carcinoma invasivo (CI). Em ambas as situações existe um potencial de malignidade. No entanto, a presença de crescimento invasivo não é um indicador do grau de malignidade do tumor e permite o prognóstico, há carcinomas foliculares mostrando mínima invasão dos vasos sanguíneos ou cápsula associados com metástase e, ao contrário, há carcinomas com envolvimento vascular ou capsular extenso com uma sobrevida prolongada sem metástases ou recidiva da doença por muitos anos (Varella-Garcia,2003).

O diagnóstico histológico de carcinoma folicular invasivo, na maioria das vezes é claro, no entanto, o desafio é diferenciar o carcinoma minimamente invasivo

do adenoma folicular que requer o estudo completo da cápsula (Varella-Garcia, 2003).

As neoplasias de Hurtle merecem uma menção especial, pois elas são um dos temas mais polêmicos, especialmente do ponto de vista do prognóstico. Neoplasias de Hurtle são aquelas formadas por mais de 75% oncócitos ou células foliculares oxifílicas. Correspondem a 2-3% dos carcinomas da tireoide e 20% dos carcinomas foliculares. No entanto, carcinomas de células oxifílicas são considerados por alguns pesquisadores como um subtipo de carcinoma folicular de tireoide e outros o consideram mais agressivo. A sobrevivência dos carcinomas foliculares de Hurtle em 15 anos é de 50-60%. Parece um carcinoma folicular não oxifílico com o mesmo grau de invasão e de tamanho (Maciel *et al.*, 2005).

Por todo o exposto, a partir de um ponto de vista clínico, é importante esclarecer o diagnóstico diferencial entre adenoma, CFMI, o CI e a variante folicular do carcinoma papilífero. Este último baseia-se unicamente sobre o reconhecimento de critérios de citologia nuclear. Punção com agulha fina tem se mostrado o teste de escolha como uma primeira abordagem para o diagnóstico. Os critérios para o diagnóstico de carcinoma papilífero permitem um valor próximo do valor preditivo positivo de 100%. Em contraste, os intervalos de incerteza oscilam entre 7 e 75%, dependendo da experiência no método. O diagnóstico de erros e testes inconclusivos são produzidos, em especial pela presença de critérios nucleares do carcinoma folicular que não são únicos, cerca de 40% das lesões são não-neoplásicas e da incapacidade de distinguir entre adenoma folicular e carcinoma (Chiappetta *et al.*, 2002).

A literatura disponível para o diagnóstico e prognóstico do carcinoma folicular é extensa, no entanto, ainda não se conseguiu encontrar um teste que claramente ajude

a determinar o comportamento biológico e o prognóstico da neoplasia folicular em particular (Moyano *et al.*, 2004).

I.3.3 Dados Citogenéticos e Moleculares em Câncer de Tireoide

Os cromossomos dos nódulos de tireoide vem sendo investigados desde 1965, e os diferentes subgrupos citogenéticos têm sido reconhecidos, alguns dos quais mostram rearranjos cromossômicos estruturais (Varella-Garcia, 2003; Caria e Vanni, 2010) . Atualmente, há estudos de imunohistoquímica, marcadores de proliferação, citometria de fluxo, análise cromossômica, citogenética, análise da atividade oncogênica, etc. e os diversos relatos de literatura descrevem alterações encontradas pelos variados métodos conhecidos.

O incremento nas técnicas de identificação de alterações genômicas trouxe um avanço importante para a detecção de áreas afetadas do DNA, um grande exemplo atual é a técnica de a-CGH que já é empregada como “padrão ouro” no diagnóstico e acompanhamento clínico de várias enfermidades. A literatura mostra que o a-CGH tem um poder de diagnóstico em torno de 10 à 20 % em enfermidades como: deficiência intelectual, malformações congênitas, distúrbios de aprendizagem, autismo e vários tipos de neoplasias., enquanto que em técnicas convencionais somente 3-5% destas anormalidades seriam detectadas (Davies *et al.*, 2005; Pinkel e Albertson, 2005a).

Nas últimas décadas ,perdas e ganhos genômicos em câncer de tireoide foram bastante analisados (Hemmer *et al.*,1998;Roque *et al.*,2001;Brunaud *et al.*,2003; Finn *et al.*,2007; Ohori *et al.*,2010; Yip *et al.*,2010; liu *et al.*,2013).

Diferentes subgrupos citogenéticos foram reconhecidos, alguns dos quais mostram rearranjos cromossômicos estruturais. Estas mudanças estruturais levam à

formação de genes de fusão *RET-PTC*, *TRK (-T)*, e *AKAP9 BRAF*, que se originam como resultado de rearranjos intracromossômicos ou intercromossômicos e são encontrados em carcinoma papilífero da tireoide. A fusão envolvendo *PPAR γ* é causada principalmente por translocações e são características do tecido neoplásico folicular (French *et al.*, 2003).

Exposição à radiação e o arranjo arquitetônico das regiões em que a cromatina dos genes é afetada durante a interfase parecem favorecer a formação de genes de fusão em carcinoma papilífero da tireoide e, possivelmente, também no carcinoma folicular (Caria e Vanni, 2010). Tumores da tireoide, que se originam de células do epitélio folicular, constituem um amplo espectro de lesões que vão desde hiperplasias às neoplasias, divididos em adenomas e carcinomas, respectivamente. Carcinoma papilífero é o tipo mais comum entre os tumores compostos por células foliculares. Alterações cromossômicas não aleatórias foram encontradas em todos esses tipos de tumores.

Hiperplasias e adenomas têm mostrado anormalidades clonais numéricas envolvendo predominantemente cromossomas 5, 7, 9, 12, 14 e 16 em trissomias (Belge *et al.*, 1996; Herrmann, 2003; Castro *et al.*, 2005), enquanto a estrutura do cromossomo 19 é freqüentemente alterada por translocações, com pontos de interrupção no tempo ou braço curto. O carcinoma folicular é caracterizado citogeneticamente por rearranjos estruturais do braço curto do cromossomo 3, que leva à perda de material. Análises citogenéticas de carcinomas papilíferos da tireoide revelaram alterações do cromossomo 10 e 22, incluindo inversões paracêntricas e translocações (Perissel *et al.*, 2000).

A variante folicular do carcinoma papilífero se comporta como carcinoma papilar convencional, mas pouco se sabe sobre as características citogenéticas desta

entidade rara. O cromossomo 22 tem-se mostrado especialmente envolvido em mudanças numéricas nas hiperplasias benignas da tireoide e adenomas, mais frequentemente consistindo de perda em vez de ganhos (Criado *et al.*, 1995; Perissel *et al.*, 2000).

Os tumores da tireoide são relevantes como um modelo para entendimento das bases moleculares da carcinogênese no epitélio humano. Mutações nos genes do *TSHR* e *GS* estão associadas com adenocarcinomas hiperfuncionantes da tireoide. A ativação do *RAS* por mutações pontuais é uma alteração genética precoce. Outras alterações genéticas estão associadas com progressão genética, a mais relevante sendo a inativação do gene *TP53*, supressor da função tumoral que é detectado quase exclusivamente em carcinomas indiferenciados (Maciel *et al.*, 2005). Por outro lado o PTC bem diferenciado, que se acredita surgir sem lesão benigna pré-existente, é caracterizado pela alta frequência de ativação dos genes *RTK*, proto oncogene *RET* e *NTRKI* (Chiappetta *et al.*, 2002).

Foi constatado que as mutações pontuais *RAS* são principalmente, se não exclusivamente, encontrados em tumores do tipo folicular. O gene *RET* codifica um receptor tirosinaquinase de fatores de crescimento pertencentes a família GDNF (fator neurotrófico derivado da glia). No câncer papilífero, a ativação deste gene acontece mediante distintas reordenações que implicam na combinação do domínio quinase com outros genes, gerando uma família de oncogenes quiméricos denominados *RET/PTC*, já foram identificados até dez tipos de reordenações diferentes. O gene *RET* (*rearranged during transfection*) codifica, no homem, um receptor transmembrana da família das tirosinoquinases (TK, do inglês *tyrosine-kinase*) para uma família de ligantes, da qual o paradigma é o fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia (GDNF, *glial cell-derived neurotropic growth factor*) . O

gene *RET* está envolvido na regulação, sobrevivência, diferenciação e migração das células derivadas da crista neural; está localizado no cromossomo 10q11.2, contém 21 exons que ocupam mais de 60kb do DNA genômico e é transcrito em pelo menos 10 isoformas alternativas. Ao contrário, rearranjos oncogênicos do *RET* e *NTRKI* e superexpressão do *TEM*, tudo levando a uma atividade enzimática do *TK* desregulado, só são detectados em PTCs (Maciel *et al.*, 2005).

Em um proporção significativa de tumores de tireoide não foram detectadas alterações genéticas significativas. Em particular, carcinomas foliculares sem ativação do gene *RAS* ou tumores papilares sem rearranjo de gene *TK* ou a superexpressão poderiam representar o modelo correto para se investigar novas alterações genéticas nestes tumores. Além disso, as diferentes conseqüências da ativação de *RAS* ou *TK* são de alguma forma intrigantes. Parece, portanto, que os dois elementos genéticos (*RTK* e *RAS*) pertencem, embora em fases diferentes, ao mesmo caminho. Em qualquer caso, estes resultados podem fornecer ferramentas para um melhor diagnóstico diferencial entre os tipos histológicos diferentes e também contribuir para uma melhor caracterização da patogenia. Além disso, a elucidação bioquímica da via de transdução de sinal, desencadeada pelas oncoproteínas ativadas, pode fornecer o marco conceitual para a novela terapêutica das abordagens ,tanto para controlar o crescimento de células tumorais como para restaurar as funções de diferenciação da tireoide (Herrmann,2003).

Os FTC apresentaram aberrações clonais com maior frequência e com mais complexidade de rearranjos que os PTC. Com mais de 40 casos analisados, a translocação t(2, 3) (q13, p25) tomou o centro do palco, sendo até agora a única confirmada por diferentes grupos. A conseqüência molecular desse rearranjo foi identificada como o rearranjo oncogênico *PAX8/PPAR*, uma fusão do fator de

transcrição da tireoide PAX8 a PPAR. *PAX8/PPAR* estava presente em cinco de oito casos de FTCs no estudo original (French *et al.*, 2003). Uma frequência semelhante de 53% foi encontrado em análise por PCR, que demonstrou fusão em oito de 15 FTCs e dois adenomas foliculares com padrão de crescimento trabecular (02/25) . A maioria dos oito casos com uma fusão *PAX8/PPAR* foram relatadas como muito invasivos (Herrmann,2003) (Figura 6).

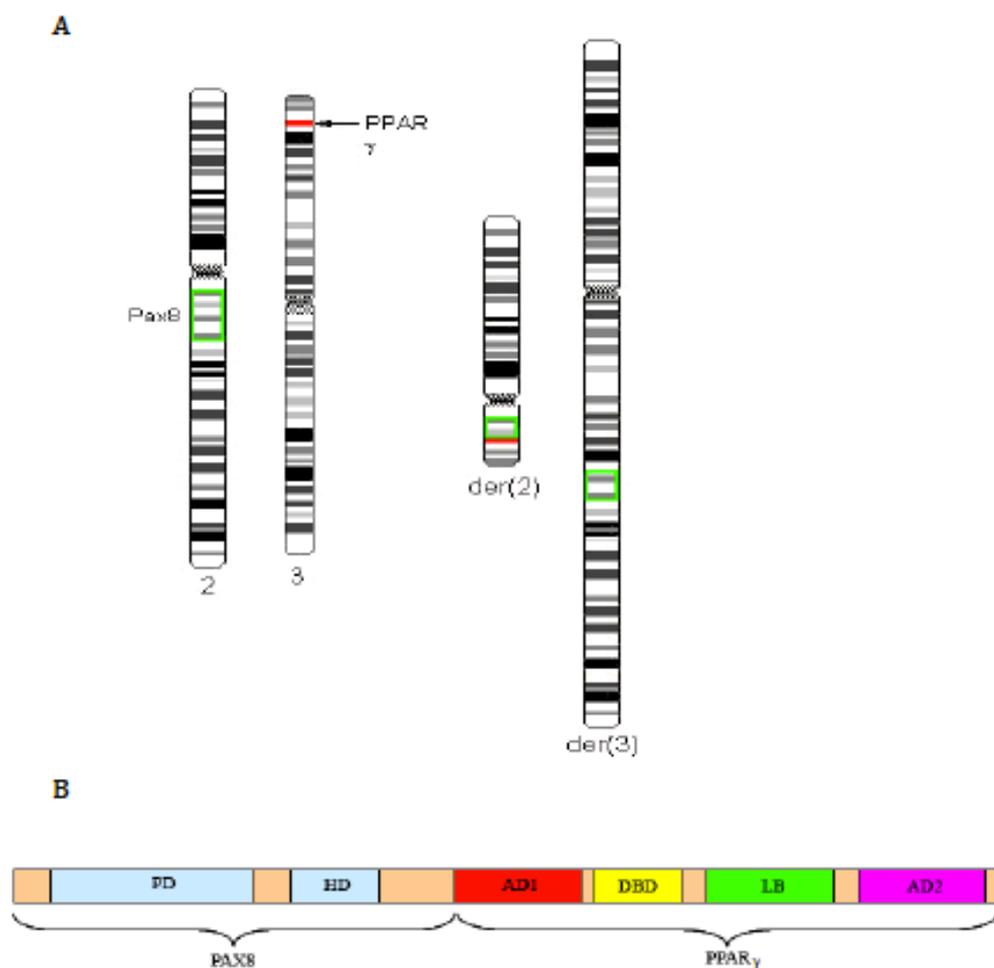


Figura 6: (A) Representação da Translocação entre os cromossomos 2 e 3, que resulta na fusão dos genes *PAX8/ PPAR γ* ; (B) Representação da proteína anormal resultante do rearranjo (disponível em http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PAX8.html).

Curiosamente, não só fusões *PAX8/PPAR* foram descritas em tumores trabeculares da tiroide, mas também é freqüente rearranjos RET (75%) (Chiappetta *et al.*, 2002). O rearranjo *PAX8/PPAR* não estava presente em 35 papilíferos e 12 carcinomas de células de Hürthle. No entanto, uma variante folicular do PTC foi relatada com a t(2, 3) (q13, p25) assim como um PTC variante de células altas com a t(3, 3) envolvendo 3p25. Se estas translocações envolvem *PAX8/PPAR* ou *PPAR* não é conhecido. *PAX8/PPAR* estava presente em 3 de 3 FTCs com exposição à radiação. Os pontos de interrupção 2q13 e 3p25 têm sido implicados em outras translocações, alguns deles não esclarecidos. Outros pontos de interrupção recorrentes em FTCs encontrados fora das regiões centroméricas são 1p13, 3p13, 6q16, 7p15, 8q24, 12q24, e 19q13 (Herrmann, 2003).

A translocação t(7, 8) (p15; q24) foi relatada em 2 FTCs amplamente invasivos com metástases ósseas e pulmonares. Outro caso com uma única anomalia (del 11q) também era amplamente invasivo (Jenkins *et al.*, 1990).

Além de translocações freqüentes, FTC é reconhecido por perda de cromossomos inteiros, com cariótipo haplotípico. Perdas cromossômicas inteiras envolvem geralmente os cromossomos 6, 8 e 11 e os acrocêntricos 13, 14, 15, 17, 18 e Y. Os cromossomos, que são menos envolvidos com a perda são o 5, 7, 12, 16, 19 e X (Caria e Vanni, 2010). Relatos de perda desses cromossomos são restritos a análise citogenética de metástases para os linfonodos ou ossos. Monossomias 2, 5 e 12 são raros, mas foram detectados em doença metastática (Roque *et al.*, 1998; Herrmann, 2003).

A análise por CGH de 69 carcinomas de tiroide encontraram mudança no número de cópias do DNA, descrevendo poucas alterações em carcinomas papilíferos, sendo que, quando presentes, todas eram de ganho. Já os carcinomas foliculares

estudados apresentavam mudanças em 80% dos casos sendo deleção a alteração mais comum, houve também um achado de perda do cromossomo 22 em 3 de 4 pacientes que morreram em decorrência do tumor folicular. Os achados de deleção também ocorreram nos carcinomas medulares e anaplásicos estudados (Hemmer *et al.*, 1999).

Singh *et al.*, 2000, avaliou por CGH 21 pacientes com carcinoma papilífero e anormalidades citogenéticas foram detectadas em 10 deles, as mais recorrentes sendo perdas nos cromossomos 1p, 9q, 17, 19 e 22, e ganho nos cromossomos 4, 6 e 13. Já as análises de Brunaud *et al.*, 2003, que estudou por CGH pacientes com tumores da tireoide não medulares familiares, na tentativa de demonstrar alguma alteração hereditária, não encontraram aberrações cromossômicas relacionadas com hereditariedade, mas foram encontrados em seus pacientes ganhos em 2q, 3q, 18p e 19 p.

A comparação da instabilidade genômica em pacientes portadores de câncer de tireoide e de neoplasia coloretal para determinar alterações que explicassem o excelente prognóstico dos portadores de tumor de tireoide em detrimento daqueles com carcinoma de cólon, demonstrou que alterações genômicas nos carcinomas papilíferos da tireoide estudados, juntamente com as encontradas nos portadores de pólipos benignos de cólon eram pequenos eventos; em contrapartida, pacientes com carcinomas mais agressivos como tumores anaplásicos da tireoide e carcinomas coloretais tinham muitos eventos detectados, demonstrando assim que as poucas alterações podem explicar o melhor prognóstico causando na célula tumoral alterações fenotípicas mínimas, sendo que os outros tumores com mais alterações tem um comportamento biológico agressivo (Stoler *et al.*, 2007).

A aplicação da técnica de aCGH para investigar alterações genéticas adicionais em indivíduos adultos e crianças portadoras de carcinoma papilífero da

tireoide pós Chernobyl, que também eram portadores ou não do rearranjo *RET/PTC* pesquisado pela técnica de FISH. Os pacientes com alteração *RET/PTC* positiva apresentaram mais deleções, enquanto as ampliações foram mais frequentes em pacientes *RET/PTC* negativa. Aberrações específicas discriminando os portadores de *RET/PTC* dos não portadores foram encontradas: aberrações nos cromossomos 1p,3q, 4p, 7p, 9p/q,10q,12q,13q e 21q. Os pacientes adultos e crianças com *RET/PTC* positivo diferem significativamente para a deleção da porção distal do cromossomo 1p. Em contraste, alterações nos tumores *RET/PTC* negativos indicaram rotas de desenvolvimento tumoral alternativas (Unger *et al.*, 2008).

Já em um estudo de 39 pacientes portadores de patologia tireoidiana, pelo método de aCGH, dentre eles 14 adenomas foliculares, 13 carcinomas papilíferos variante folicular e 12 carcinomas papilíferos da tireoide, na tentativa de caracterizar CNVs específicas de cada subtipo tumoral pra melhorar uma classificação pré-operatória futura, foram encontradas ampliações do cromossomo 7 e 12 em adenomas foliculares e deleção do cromossomo 22 em papilífero clássico e variante folicular (Liu *et al.*, 2013).

I.4 OBJETIVOS

I.4.1 Objetivo Geral

Analisar a ocorrência de Variações no Número de Cópias (CNVs) no genoma de tumores bem diferenciados da tireoide, buscando identificar alterações recorrentes nesses tumores que possam ser utilizadas como possíveis marcadores para sua classificação.

I.4.2 Objetivos Específicos

- Hibridizar amostras de tecido tireoidiano patológico em microarranjos contendo 180.000 clones.
- Verificar a concordância de perdas e ganhos recorrentes entre as amostras.
- Verificar a existência de perdas e ganhos que possam ser associadas ao tipo histopatológico.
- Comparar os dados obtidos com aqueles da literatura ,para apoiar ou refutar padrões genômicos associados a carcinoma bem diferenciado do tipo folicular da tireoide.

II .MATERIAL E MÉTODOS

II.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas . As amostras só foram coletadas de casos em que o paciente ou seu responsável assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I).

II.2 AMOSTRAS

As amostras foram obtidas após procedimentos cirúrgicos realizados nos Hospitais Saúde da Mulher e Ofir Loiola, no período de junho 2009 a junho 2013, pelo médico responsável pelo paciente (cirurgião de cabeça e pescoço); ainda dentro da sala cirúrgica a tireoide foi seccionada longitudinalmente imediatamente após sua retirada para identificação macroscópica de tecido tireoidiano com alteração patológica, seguido de obtenção de fragmento desta área que foi transportada em meio de cultura RPMI para o Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas (LCTC-IEC). Em condições adequadas, cada biópsia foi dividida em duas partes equivalentes, sendo uma para preservação e posterior extração de DNA e a outra para cultivo celular. A identificação histológica das amostras foi feita a partir de dados do laudo histopatológico expedido posteriormente pelo departamento responsável.

Foi utilizado um protocolo padrão para anamnese destes pacientes, no qual o médico cirurgião após entrevista e avaliação de exames laboratoriais relacionava os seguintes achados: sexo, idade, cor, profissão, antecedente de tratamento

radioterápico ou quimioterápico, dosagem de hormônios tireoidianos, presença de doença autoimune, antecedentes pessoais, antecedentes familiares, risco de exposição a agentes mutagênicos (tabagismo, etilismo, irradiação solar, elementos radioativos) e resultado de punção aspirativa por agulha fina.

Dentro da variedade de achados anatomopatológicos encontrados ,num total de 110 amostras,foram selecionados quatro pacientes com carcinoma folicular (Tabela 2) e quatro que apresentaram adenoma folicular como resultado definitivo de patologia. Estes foram o foco do trabalho. Acrescentou-se também, como amostras controle, três pacientes com bócio, dois pacientes com hiperplasia (Tabela 3) e uma amostra de DNA obtida de pessoa com tireoide normal. A Tabela 2 apresenta um resumo dos dados dos pacientes com carcinoma folicular. O total de amostras analisadas foi 14.

Para fins de análise global, aos dados obtidos, somaram-se aqueles obtidos por SOUZA , 2014 em carcinomas papilíferos (6 pacientes com carcinoma papilífero, sendo 4 com a forma clássica e 2 com a variante folicular)já que consistem e lesões malignas bem diferenciadas derivadas do mesmo tipo celular.

TABELA 2: Pacientes com carcinoma folicular

PATOLOGIA	CARCINOMA FOLICULAR			
PACIENTE	T8	T14	T52	T100
SEXO	F	F	F	M
IDADE	52	84	48	24
COR	P	B	P	B
PAAF	FOLICULAR	COLOIDE	COLOIDE	COLOIDE

Legenda: P=pardo ; B = branco ; F= feminino ; M = masculino

TABELA 3: Pacientes com adenoma folicular, hiperplasia e bócio.

PATOLOGIA	BOCIO			HIPERPLASIA		ADENOMA FOLICULAR			
PACIENTE	T13	T43	T78	T10	T54	T21	T38	T46	T55
SEXO	F	F	F	F	F	F	F	F	F
IDADE	30	51	39	58	62	27	21	39	51
COR	B	B	P	N	P	P	P	P	B
PAAF	Fol	INS	NÃO	NÃO	NÃO	INS	COL	COL	Fol

Legenda: F = feminino; B = branco; P = pardo; N = negro; Fol = folicular ; INS =insuficiente; COL = coloide

II.3 EXTRACÃO DO DNA

Primeiramente as amostras de tecidos tumorais estocadas no refrigerador a – 86° foram retiradas, maceradas e posteriormente homogeneizadas em tampão de extração e digeridas com proteinase K. Após esta digestão, o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol, para então ser dissolvido com tampão TE e conservado em refrigerador (Sambrok *et al.*,1989). As amostras foram quantificadas e sua qualidade testada em gel de agarose (1%) a fim de se observar a integridade das mesmas . Somente amostras não fragmentadas foram utilizadas no estudo.

II.4 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM MATRIZ (aCGH)

Para o aCGH foi utilizada a matriz *SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K*, da Agilent. Essa matriz contém cerca de 120.000 sondas de aCGH, cobrindo o total de clones do consórcio ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays*), disponível em <http://isca.genetics.emory.edu>.

II.4.1 Digestão Enzimática e Marcação das Amostras

O DNA deve estar composto de fragmentos entre 200 a 500 pb aproximadamente, o que foi obtido pela digestão enzimática. Para isso, o DNA extraído foi diluído na proporção de 1 µg/22 µL de água ultra pura. O mesmo foi feito com o DNA de referência (*Human Reference DNA Male or Female* da Agilent), disponibilizado no kit. As amostras foram fragmentadas através de digestão por enzimas de restrição e marcadas com Cy5-dUTP, enquanto o DNA de referência foi marcado com Cy3-dUTP, utilizando-se o kit *SureTag Complete DNA Labeling*, seguindo-se as instruções do fabricante:

1. Em cada tubo contendo o DNA genômico diluído, foram adicionados 5,8 µL do *Digestion Master Mix*, composto de água ultra-pura, Tampão de Restrição Enzimática 10X, BSA e das enzimas Alu I e Rsa I.
2. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas, e logo em seguida a 65°C, por 20 minutos.

Após a fragmentação do DNA das amostras, o próximo passo foi a marcação do mesmo, também seguindo-se as instruções do fabricante:

1. 5 µL de um *primer* randômico foram adicionados à mistura.

2. Incubaram-se os tubos a 95°C por 3 minutos, e depois em gelo por 5 minutos.
3. Foram acrescentados 21 µL do *Labeling Master Mix*, composto por água ultrapura, tampão de reativação 5x, 10x dNTPs, Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP e Exo-Klenow.
4. Após misturar, pipetou-se o material gentilmente, para ser em seguida incubado a 37°C por duas horas e depois a 65°C, por 10 minutos.

II.4.2 Purificação

Após a marcação, o material foi purificado. Para isto, acrescentaram-se 430 µL de 1xTE (pH 8.0) em cada amostra e transferiram-nas para colunas de purificação para serem centrifugadas a 1400x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e mais 480 µL de 1xTE (pH 8.0) foram adicionados. Após a segunda centrifugação, a coluna foi invertida em tubo coletor novo de 2 mL e centrifugada a 1000 x g para obtenção do material purificado. Este foi quantificado em *Nanodrop* para a medição das concentrações do DNA e dos marcadores, que foram utilizados junto com a medição do volume final da amostra, para a estipulação dos valores de atividade específica dos marcadores e rendimento do processo de marcação. Estes valores indicaram o funcionamento das etapas anteriores e definiram a escolha dos pares de amostras (DNA de referência e teste) a serem formadas (os valores entre estas devem ser semelhantes).

II.4.3 Hibridização

Antes do processo de hibridização, as amostras foram pré-tratadas, com a adição de 71 µL do *Hybridization Master Mix* (composto de tampão de hibridização,

agente de bloqueio 10X concentrado e Cot-1 DNA) em cada amostra (DNA de referência + DNA da amostra a ser testada) e essa mistura foi incubada a 95°C por 3 minutos e imediatamente transferidas para um banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Após essa etapa, o material foi centrifugado por 1 minuto a 6000 x g e então estava pronto para a hibridização.

O processo de hibridização seguiu as instruções do fabricante, a saber:

1. Em uma lamínula específica, despejaram-se 100 µL da solução em cada um dos poços.
2. A lâmina com microarranjos foi encaixada sobre a lamínula, e as duas unidades – lâmina e lamínula – foram fixadas com uma base de fixação.
3. Manualmente foi ajustada uma braçadeira para manter o conjunto bem fixado.
4. O conjunto foi movido verticalmente para que o líquido espalhasse uniformemente sobre cada arranjo e para que possíveis bolhas de ar não se fixem nessa região.
5. O conjunto foi colocado em uma câmara de hibridização e mantido a 65°C por 24 horas, com uma rotação de 20 rpm.

II.4.4 Lavagem

A lavagem dos microarranjos foi feita em ambiente pobre em ozônio (figura 6). Primeiramente, o conjunto “lâmina+lamínula” foi retirado da base de fixação e mergulhadas em tampão de lavagem 1 (*Wash Buffer 1*) para ajudar na dissociação. Após isso, as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo novamente tampão de lavagem 1 sob agitação com magneto, por cinco minutos. Tanto a dissociação como a primeira lavagem foram feitas à temperatura ambiente. As

lâminas foram então transferidas para uma terceira cuba contendo o tampão de lavagem 2 (*Wash Buffer 2*), em agitação com magneto, à temperatura de 37°C. Finalmente, as lâminas foram cobertas com uma lamínula protetora de ozônio e encaixadas em um estojo para proceder para a próxima etapa (Figura 7).

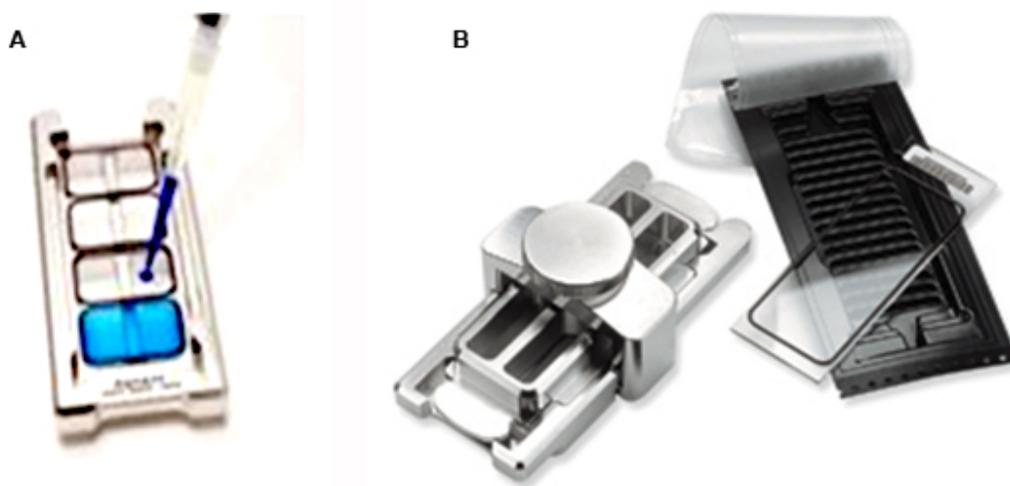


Figura 7- (A): Aplicação do material na lâmina contendo os microarranjos; (B) Braçadeira e lamínula utilizadas para vedar a lâmina durante o processo de hibridização .Fonte :<http://www.mogene.com/img/contenido/Agilent.jpg>

II.4.5 Escaneamento e Extração de Dados

Os estojos com os microarranjos foram devidamente encaixados em cassetes do *scanner*. O *scanner* tem a capacidade para até 48 estojos de cada vez. Após o encaixe e fechamento da tampa, o controle e obtenção das imagens do *scanner* foram feitos com o uso do software *Feature Extraction v10.10*, que extrai imagens com a extensão .TIFF a partir dos microarranjos (Figura 8).

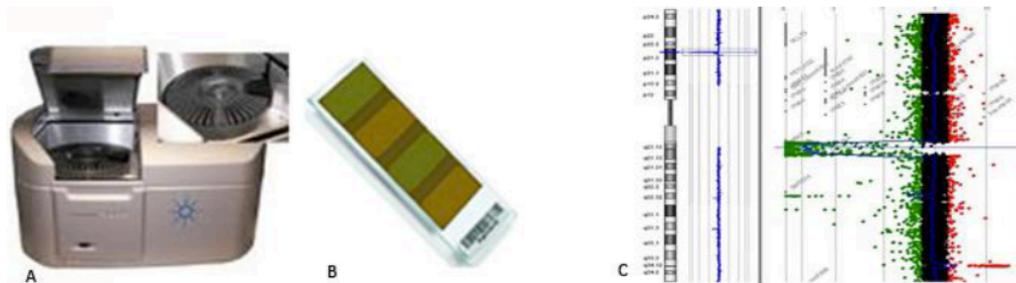


Figura 8: Alguns aspectos do processo: A- scanner; B - lâmina contendo arranjos para quatro amostras; C – Análise dos resultados, com segmentos verdes representando deleções e vermelho amplificações (<http://www.mogene.com/img/contenido/Agilent.jpg>)

II.4.6 Obtenção dos Dados

As imagens obtidas pelo escaneamento, transformadas em arquivos de imagem com extensão .TIFF, foram analisadas com auxílio do software *Agilent CytoGenomics 2.7.8*, no modo multianálise, que permite uma análise simultânea das amostras.

II.5 – ANÁLISES

II.5.1 – Levantamento das Regiões de Recorrência

Na análise das regiões recorrentes, foram consideradas CNVs que apresentaram-se comuns em pelo menos duas amostras, sem considerar a patologia em questão. As regiões foram organizadas em tabelas, onde cada amostra afetada era marcada, sendo vermelho para deleções e azul para amplificação (anexo 2).

II.5.2 – Critério de Consideração das CNVs como Patogênicas

Regiões que apresentaram padrão de alteração nas amostras controles foram

desconsideradas neste trabalho. Além disso, aquelas regiões apontadas pelo *software* como comuns na população também foram desconsideradas.

II.5.3 – Triagem de CNVs Relevantes ao Desenvolvimento de Carcinomas Foliculares

Cada CNV identificada teve sua distribuição por tipos patológicos analisada. Foram consideradas relevantes, CNVs que se manifestaram apenas em carcinomas foliculares. CNVs observadas a partir de adenomas foliculares também foram analisadas com atenção, visto que poderiam trazer informações sobre uma via hipotética de desenvolvimento (adenomas foliculares → carcinomas foliculares).

II.5.4 – Análise das Distribuições por Cromossomos de Amplificações e Deleções

Após registradas as CNVs de ocorrência apenas em amostras patológicas, deleções e amplificações foram analisadas à parte. Dessa forma, todas as deleções que afetavam um mesmo cromossomo foram somadas (referindo-se aqui ao tamanho de cada alteração, e não ao número delas). Os valores obtidos foram considerados como percentagens do comprimento total de cada cromossomo (seguindo as informações coletada do *Emseble*, que fornece o tamanho de cada cromossomo humano em pares de bases). O mesmo raciocínio foi usado na análise das amplificações.

II.5.5 – Análise das Distribuições de Regiões de Intersecção por Cromossomo

Regiões de intersecção são aquelas regiões de CNVs que foram comuns a mais de uma amostra. Para análise das distribuições de cada uma delas por cromossomo, foram utilizados os mesmos cálculos do item anterior, com a diferença que desta vez a análise foi feita por grupo. Assim, analisaram-se as regiões de

intersecção para amostras de adenomas foliculares e para as amostras de carcinomas foliculares, separadamente.

III-RESULTADOS

III.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Treze pacientes com patologia e mais um caso de paciente sem doença diagnosticada da tireoide foram selecionados. Destes , 12 são do sexo feminino e 1 do sexo masculino . As idades dos pacientes com doença tireoidiana estudados variam de 21 a 84 anos , com média de 45,07 anos. Quanto a raça , 7 são pardos, 5 brancos e 1 negro. Nenhum paciente selecionado foi submetido a radio e/ou quimioterapias prévios .

Quatro pacientes com diagnóstico de adenoma folicular da tireoide, todas do sexo feminino, foram analisadas. A média de idade foi de 34,5 anos, com dosagem de hormônios e anticorpos tireoidianos normais, sem antecedentes pessoais de exposição a agentes mutagênicos; a paciente T55 tem uma longa história familiar de pacientes com neoplasia de mama e é proveniente do Canadá. Duas pacientes são donas de casa, uma é caixa de supermercado e outra secretária. A descrição anatomopatológica dos achados mostra em todos casos nódulo único encapsulado bem delimitado.

Os quatro pacientes com carcinoma folicular da tireoide tinham idade que variava de 24 a 84 anos com média de 52 anos, sendo três mulheres e um homem. As três mulheres não realizavam atividades laborais, apenas o homem, que era gestor de logística. Todos os pacientes apresentavam dosagens de hormônios e anticorpos dentro da faixa de normalidade. A paciente T52 apresentava quadro atópico, com uso de anti-histamínicos. A paciente T14 foi tabagista por mais de 10 anos tendo suspenso 5 anos antes da cirurgia. Não houve relato de antecedentes familiares de

doença da tireoide ou neoplasia maligna. Ressalta-se o fato de 3 dos 4 pacientes (75%) apresentarem como resultado material colóide ao exame de PAAF, ou seja, sem prognóstico de carcinoma tireoidiano. Todos os quatro, ao exame físico prévio tinham tireoide aumentada de tamanho, as mulheres tinham aumento nodular bilateral e a paciente T14 tinha linfonodos cervicais palpáveis a direita; o paciente do sexo masculino apresentava aumento nodular do lobo direito.

A paciente T14 foi submetida a tireoidectomia total e ressecção de linfonodos cervicais, apresentou em seu resultado anatomopatológico carcinoma folicular bem diferenciado grau I, invasivo com invasão vascular angiolinfática, metastático para linfonodos. Esta paciente foi a óbito um ano após o tratamento cirúrgico por consequência de metástase pulmonar, e seu filho apresentou tumor de tireoide há um ano.

O resultado anatomopatológico dos pacientes T8, T52 e T100 foi de tumor folicular minimamente invasivo, nas mulheres ambos os tumores apresentavam 4 cm de diâmetro. No entanto, a paciente T52 apresentou área metastática na crista ilíaca a esquerda na captação do iodo pós operatória. O estadiamento foi T8 = T3N0M0 (Estadio III); T14 = T2N1bM0 (Estadio IVA); T52 = T3N0M0 (Estadio III) e T100 = T3N0M0 (Estadio I).

Todos os pacientes vivos mantêm acompanhamento e seguimento oncológico pós-cirúrgico até a presente data.

III.2 - DELEÇÕES X AMPLIFICAÇÕES

A Tabela 4 mostra o número de deleções, amplificações e o total de CNVs (soma de deleções mais amplificações) em cada amostra analisada, considerando apenas adenomas e carcinomas foliculares. Em adenomas, houve uma frequência

maior de deleções do que amplificações em duas das quatro amostras (T46 e T55) enquanto as outras duas (T21 e T38) mostraram um padrão inverso, maior frequência de amplificações do que de deleções. Já os carcinomas foliculares mostraram frequências de deleções e amplificações bem próximas, com exceção da amostra T52, onde houve uma maior taxa de amplificação. A amostra T100, de um paciente masculino, mostrou uma taxa total de alterações maior do que das demais pacientes do sexo feminino com carcinomas foliculares.

Tabela 4 - Valores absolutos de deleções e amplificações por amostras de adenomas de carcinomas foliculares analisadas

AMOSTRA	HISTOPATOLÓGICO	DELEÇÕES	AMPLIFICAÇÕES	TOTAL
T21	ADENOMAS	3	27	30
T38	FOLICULARES	74	153	227
T46		113	52	165
T55		66	28	94
T8	CARCINOMAS	48	45	93
T14	FOLICULARES	40	45	85
T52		8	58	66
T100		64	69	133

O total de regiões recorrentes, ou seja, que apresentaram CNVs em pelo menos duas amostras, é mostrado no Quadro 1.

Em adenomas, os cromossomos 10, 12 e 14 foram os maiores alvos de amplificações, com ganhos totais para eles de 3,04 a 10,64%, 4,74 a 9,93% e 3,08 a 24,16%, respectivamente. Quanto as deleções, os cromossomos 7, 10, 15, 17, 19 e 22 mostraram alta taxa de alteração em três das quatro amostras, sendo os cromossomos 17 (com taxa de variação de 10,62 a 27,70%) e 19 (com taxa de variação de 19,53 a 80,31%) os mais alterados (Quadro 2).

Em carcinomas, as ampliações foram mais frequentes nos cromossomos 7 e 8, abrangendo 1,70 a 19,23% e 3,20 a 89,90% deles, respectivamente. O cromossomo 14 vem em seguida, com taxas que variaram de 1,23 a 15,50% entre as amostras. As taxas de deleção se mostraram mais baixas em carcinomas foliculares do que em adenomas foliculares, sendo os cromossomos 11 e 22 os principais alvos delas. Os valores variaram de 1,81 a 28,33% no cromossomo 11 e 4,59 a 68,20% no cromossomo 22 (Quadro 2).

Quadro 1: Lista de regiões relevantes para distinção entre adenomas foliculares e carcinomas foliculares da tireoide.

R.I.	T30	T10	T34	T21	T38	T46	T55	T8	T14	T52	T100	T26	T33	T36'	T31	T85	T18
	normais	Hiperplasias		Adenomas foliculares			C. Folicular			CPVF	C. Papilífero						
8P22																	
3P21.31																	
5Q13.1																	
5Q31.1																	
5Q31.2																	
7Q11.23																	
7Q11.23																	
8Q13.1																	
11Q23.3																	
12P13.33-P13.32																	
12P13.31																	
14Q32.31-Q32.33																	
17q12																	
17q21.31																	
17q25.1-Q25.2																	
19p13.3																	
19q13.2																	
22q11.21-q11.22																	
18q11.2																	
1P36.2																	
1P35.1																	
1P34.3																	
1P34.1																	
1P31.3																	
1P31.1																	
1Q21.3																	
1Q21.3																	
1Q22																	
1Q31.1																	
1Q31.2																	
1Q42.11-Q42.12																	
1Q42.12																	
1Q42.13-Q42.2																	
2P25.3																	
2P25.3																	
2P13.3																	

(LEGENDA: R.I: Região de Interseção; Azul = Amplificação; Vermelho = Deleção; Amarelo = Região amplificada em adenoma e deletada em carcinoma folicular; Verde Claro = Região alterada em adenoma, mas não em carcinoma folicular; Verde Escuro = região alterada em carcinoma folicular mas não em adenoma

QUADRO 2: Comparação da distribuição de ampliações e deleções por cromossomo (considerando apenas as regiões de interseção entre duas ou mais amostras de um mesmo tipo tumoral - adenomas ou carcinomas foliculares). Os valores numéricos representam a quantidade afetada de cada cromossomo (em porcentagem).

		ADENOMAS FOLICULARES																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
OCORRÊNCIAS		3,0	3,0	0	0	4,0	1,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
AMPLIFICAÇÃO		0,0	0,0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DELEÇÃO		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		CARCINOMAS FOLICULARES																							
OCORRÊNCIAS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
AMPLIFICAÇÃO		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DELEÇÃO		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Legenda: Azul : <1 %; Verde: de 1 a 5%; Amarelo: de 5,1 a 10%; laranja de 10,1 a 20%; vermelho: >20%

III.3- REGIÕES DE SOBREPOSIÇÃO (REGIÕES DE INTERSECÇÃO)

Ao todo, 725 CNVs comuns a duas ou mais amostras foram identificadas. Ao excluir aquelas que foram observadas também na amostra normal, restaram 703 regiões com variação. Em termos de porcentagem, isto significaria aproximadamente 97% das CNVs se apresentando apenas em amostras patológicas. O Quadro 3 apresenta a porcentagem de cada cromossomo afetada por elas, diferindo deleções de ampliações.

No Quadro 2, apresenta-se a comparação entre as distribuições de ampliações e deleções entre adenomas e carcinomas foliculares. A distribuição é feita por cromossomo e considera a soma de deleções ou ampliações em cada uma destas organelas. A partir do quadro é possível observar que o cromossomo 19 é um dos mais afetados em adenomas, sendo a principal alteração neste caso a deleção (76,03% do cromossomo é comprometido). Já em carcinomas, os cromossomos 8 e 22 são os mais afetados (21,61% com amplificação e 64,88% com deleção, respectivamente).

Agrupando-se os dados de acordo com os tipos tumorais ou tipo patológico (no caso das hiperplasias) e tendo como foco aquelas alterações que possibilitem a separação entre adenomas foliculares e carcinomas foliculares, foi possível triar 388 regiões do total de 703. Destas, 77 mostraram-se tanto em adenomas quanto carcinomas, mas com alteração inversa (deleção em um tipo tumoral, amplificação no outro e vice-versa), 198 somente em carcinomas foliculares e 113 apenas em adenomas. Uma análise mais aprofundada, onde considerou-se as frequências de cada

alteração, reduziu este número para 104 regiões, dos quais 18 serão destacadas neste trabalho (Quadro 4).

Das 18 regiões, apenas duas (8p22 e 12p13.33-p13.32) mostraram exclusividade para carcinomas foliculares. Outras duas (5q13.1 e 22q11.21-q11.22) foram observadas em carcinomas bem diferenciados, mas não em adenomas. Oito pareceram seguir por uma linha de formação tumoral específica, indo de hiperplasia para adenoma folicular e de adenoma para carcinoma papilífero, mas não para carcinoma folicular. Por fim, seis regiões apresentaram alterações inversas, com amplificação em carcinomas foliculares e deleção em adenomas, estes últimos também seguindo a linha para carcinomas papilíferos.

III.4- REGIÕES DE RELEVÂNCIA

Considerando a frequência de cada CNV em cada grupo de patologias e a distribuição de cada uma delas por estes grupo, foi possível identificar 17 regiões com possível relevância para o desenvolvimento tumoral de carcinomas foliculares.

Duas destas regiões se destacaram por mostrarem padrões de amplificação apenas em carcinomas foliculares: 8p22 e 12p13.32-p13.33, com 100% das amostras (4/4) e 75% (3/4) mostrando este perfil, respectivamente. A amplificação em 5q13.1 também foi observada apenas em carcinomas (3/4 amostras), mas não em adenomas. As demais regiões, apresentadas no Quadro 4, foram caracterizadas por um perfil de deleção em bócios, hiperplasias e adenomas foliculares, mas ausência deste tipo de alteração ou perfil reverso (amplificação) em carcinomas foliculares.

IV- DISCUSSÃO

Os carcinomas malignos da glândula tireoide correspondem à patologia de glândula endócrina mais comum (Maciel *et al.*, 2005). Derivadas de dois tipos celulares, tem uma prevalência em indivíduos do sexo feminino (Kimura, 2012). Os tumores classificados como bem diferenciados representam mais de 95% dos casos com um crescimento indolente e praticamente assintomático (Gerhard *et al.*, 2010). Seu diagnóstico ao longo das décadas tem aumentado significativamente pelo incremento das técnicas de imagem, e com isso o número de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico cresceu paralelamente (Ward *et al.*, 2006), acrescemos o longo período de seguimento destes pacientes já que recidivas tumorais são descritas até 20 anos após o primeiro tratamento (Brassard *et al.*, 2011).

Dentre os tumores bem diferenciados prevalece o tipo papilífero que tem na PAAF um excelente recurso para diagnóstico pré operatório, já que apresenta alterações histológicas patognomônicas que asseguram seu diagnóstico preciso (Moyano *et al.*, 2004); em contrapartida o tipo folicular se confunde com as formas benignas, pois não apresenta alterações citológicas específicas assim sendo todo nódulo tireoidiano que evidencie alteração folicular deve ser operado sendo o risco de malignidade de 20-40% (Pineda *et al.*, 2003; Gerhard *et al.*, 2010). Há também pacientes que na avaliação pré-operatória são classificados como portadores de doença benigna da tireoide sendo, por isso, submetidos a cirurgia parcial tornando necessária reabordagem cirúrgica quando do diagnóstico de malignidade (Pineda *et al.*, 2003; Chagas *et al.*, 2008). Pelo exposto, a necessidade de métodos diagnósticos mais eficazes se faz necessária para a melhor indicação de tratamento cirúrgico e a melhor condução dos casos de malignidade, prevenção e detecção dos candidatos a

recidiva precoce e tardia, determinar os fatores responsáveis pela prevalência no sexo feminino, agressividade no sexo masculino, hereditariedade dentre outros (Wang, 2002).

Um tumor completamente desenvolvido é muito heterogêneo com a presença de subclones celulares e distintos padrões de expressão . Os oncogenes, que são uma mutação que incrementa a atividade de certa proteína são caracterizados por ampliações, em contrapartida os genes supressores se encontram inativados devido a mutação de ambos alelos levando a deleção de um deles no desenvolvimento tumoral e consequente perda da expressão (Gil , 2006).

A variação no número de cópias do DNA é apontada como responsável por um grande número de alterações genéticas já que levam a diferentes formas de expressão do fenótipo. Grandes e/ou pequenas as deleções ou ampliações podem ser detectadas pelo estudo de aCGH uma poderosa ferramenta no estudo de diferentes patologias (Freeman *et al.*, 2006).

Estudos de citogenética em tecido tireoidiano têm demonstrado alterações no material genético que tentam caracterizar as diferentes formas de tumor. O câncer bem diferenciado de tireoide parece estar associado com anormalidades genéticas específicas, as mais comumente descritas sendo dos genes *BRAF*, *RAS* e *RET* com mutações e fusões sendo observadas principalmente nos tumores bem diferenciados da tireoide do tipo papilífero (Messina *et al.*, 2012).

As etapas mais iniciais do desenvolvimento do câncer de tireoide parecem ser devidas a ativação de protooncogenes (*RAS* ,*RET* ,*NTRK* ,*MET* ,*GSP* e receptor de TSH), sua expressão alterada se associa desde adenomas a carcinomas papilífero e folicular. Os carcinomas indiferenciados, por sua vez apresentam mutações de genes supressores como o *TP53*, que surgem em etapas mais tardias (Gil, 2006).

O presente estudo buscou caracterizar alterações citogenéticas estudadas pelo método de aCGH: deleções e ampliações ,que possam estar presentes em tumores bem diferenciados da tireoide do tipo folicular identificando elementos específicos de evolução e/ou progressão da doença .

Foram selecionados 13 pacientes com doença tireoidiana submetidos a tratamento cirúrgico e um controle sadio. Tivemos na amostra uma prevalência do sexo feminino (12 mulheres: 1 homem), com uma média de idade de 45 anos, dados compatíveis com a literatura (Gerhard *et al.*, 2010). Possivelmente, no nosso estudo um achado três vezes maior no sexo feminino provavelmente se deva ao fato da escolha da amostra ser determinada pela qualidade do material de análise.

A distribuição dentre as raças foi igual entre pardos e brancos, não encontramos na literatura menção a predomínio racial o que no nosso caso não pareceu relevante. Nenhum paciente recebeu tratamento radio e/ou quimioterápico prévio que poderiam ocasionar alterações e instabilidade do material genético promovendo carcinoma (Maciel *et al.*, 2005; Unger *et al.*, 2008).

Na avaliação citogenética da amostra, o número de deleções , ampliações e o total de variações de número de cópias estão demonstrados na Tabela 4. Quando consideramos apenas adenomas e carcinomas foliculares, observamos que nos adenomas houve uma frequência maior de deleções do que ampliações em duas das quatro amostras, que são as duas pacientes com idades mais avançadas, enquanto nas duas pacientes mais jovens (T21 e T38), o padrão é inverso, com mais ampliações do que deleções, sugerindo que a faixa etária possa interferir no padrão de variação (Hemmer *et al.*, 1999). Por outro lado, Liu em 2013 encontrou padrão predominante de amplificação em 14 pacientes com adenoma folicular estudados, porém não há relato de alteração por faixa etária, e a sua média de idade era de 52 anos (Liu *et al.*,

2013), enquanto a média de nossas duas pacientes com um maior número de ampliações foi de 24 anos.

Nos carcinomas, as frequências de deleções e ampliações são bem próximas, concordante com os achados de Hemmer *et al*, (1999) que encontraram taxas de 65% de deleções e 50% de ganho em carcinomas foliculares. Os achados de ampliações maiores que deleções da paciente T52 podem sugerir um padrão de comportamento diferente para tumores minimamente invasivos com potencial metastático, já que a mesma apresentava implante ósseo precoce. No entanto, a paciente T14 que foi a óbito pela doença metastática não apresentou padrão diferente da amostra afetada, mas sim idade avançada e carcinoma folicular invasivo, que podem ser considerados como fatores de risco. Outro fato relevante é o paciente masculino mostrar taxa de alterações maior que as outras pacientes, demonstrando um comportamento mais anárquico no sexo masculino.

Enquanto os adenomas parecem mostrar uma frequência maior de variações com predomínio de ampliações em pacientes mais jovens e deleções nos mais velhos, o que pode também demonstrar um perfil diferente de evolução, os carcinomas tem uma frequência mais próxima sem alteração com a faixa etária, discordante dos achados de Qureshi *et al*. (2013), que não mostraram diferença entre ganhos e perdas nos adenomas e carcinomas estudados.

Em adenomas, os cromossomos 10, 12 e 14 foram os maiores alvos de ampliações, com ganhos totais para eles de 3,04 a 10,64 %, 4,74 a 9,93% e 3,08 a 24,16%, respectivamente. Liu *et al*. (2013), também encontrou amplificação do cromossomos 7 e 12 em adenomas foliculares. Quanto as deleções, os cromossomos 7, 10, 15, 19 e 22 mostraram alta taxa de alterações em três das quatro amostras, sendo os 17 (com taxa de variação de 10,62 a 27,70%) e 19 (com taxa de variação de

19,53 a 80,31% os mais alterados (Quadro 2), em parte concordante com estudos anteriores (Hemmer *et al.*, 1999; Qureshi *et al.*, 2013). Sabe-se que p53 é codificado no cromossomo 17 podendo-se considerar pelo exposto como uma das alterações iniciais pré-neoplásicas (Messina *et al.*, 2012), já no cromossomo 19 encontramos os genes codificadores das apolipoproteínas, responsáveis pelo metabolismo lipídico, e os genes codificadores da proteína serina treonina quinase responsáveis pela mediação do crescimento endotelial, fibroblástico e epitelial tendo papel fundamental no processo de apoptose, proliferação celular, metabolismo do glicogênio, neurotransmissão entre outros (fonte Pubmed .org).

Em carcinomas, as ampliações foram mais frequentes nos cromossomos 7 (Roque *et al.*, 1998) e 8, abrangendo 1,70 a 19,23% e 3,20 a 89,90% deles, respectivamente. Nas regiões amplificadas do cromossomo 7 encontramos genes responsáveis pelo pareamento cromossômico (*STAG3L3*), reparo do DNA (*PMS2L2*), crescimento celular e diferenciação (*LOC100093631*), *YWHAG* (o aumento da sua expressão está associado com progressão tumoral e pior prognóstico), gene codificador de *BAZ1B* (proteína multifuncional na transcrição, reparo e replicação); e o gene *MIR4284* afeta a estabilidade e tradução do mRNA. Já nas regiões amplificadas do cromossomo 8, encontramos genes que codificam a proteína tireoglobulina, os genes da modulação transcricional (*C8orf44*) e proteínas responsáveis pela flexibilidade da expressão dos genes (*SNORD 87*). Na região 8p22, região com ampliações presente exclusivamente nos pacientes com carcinoma folicular da nossa amostra, encontramos os genes *SLC7A2* (responsável pelo estresse oxidativo), *PDGFRL* (quando inativado tem importante papel no desenvolvimento de carcinomas), *NAT2* (pode estar associado a ativação de um ou mais pro-carcinógenos), *MUTSI* (gene supressor tumoral e inibidor de crescimento), *FGL1*

(presente em hepatocarcinomas), *PCMI* (estudos mostram que os níveis de proteína diminuem drasticamente e sua localização está alterada em tumores de tireoide), *NAT1*, *NAT2* e *PSD3* (estes apresentando alterações em tumores de mama, Sistema Nervoso ventral (SNC) , ovário , fígado e reto (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)).

O cromossomo 14 vem em seguida, com taxas que variaram de 1,23 a 15,50% entre as amostras, um cromossomo descrito em diversas patologias onde invariavelmente sofre translocações, promovendo perda do controle sobre o crescimento e divisão celular. Alterações do cromossomo 14 (deleções) são responsáveis pelo hipotireoidismo congênito onde há mal formação ou agenesia da glândula tireóide.

As taxas de deleção se mostraram mais baixas em carcinomas foliculares do que em adenomas foliculares, sendo os cromossomos, 11 e 22 os principais alvos delas. Os valores variaram de 1,81 a 28,33% no cromossomo 11 e 4,59 a 68,20% no cromossomo 22 (Quadro 2). Dados concordantes com Hemmer et al., (1999) que tem achados de deleção em 65 % dos casos, sendo o cromossomo 22 o mais afetado (Hemmer *et al.*, 1999). Em amostras de carcinomas minimamente invasivos, com baixas taxas de deleção, apenas o cromossomo 22 encontrava-se deletado (Hemmer *et al.*, 1999; Qureshi *et al.*, 2013). O cromossomo 11 codifica muitos genes relacionados a transcrição (*DDX6*, *CXCR5*, *UPK2*, *FOXRI*, *CCDC84*, *RPS25*, *MIR3656* ,etc) e o cromossomo 22 codifica o PPAR γ (um conjunto de proteínas receptoras nucleares que regulam a expressão dos genes, a diferenciação celular, desenvolvimento e o metabolismo). A proteína gerada pela fusão do PPAR γ com o fator de transcrição PAX8 é descrita como fator precursor de carcinoma da tireoide (French *et al.*, 2003; Caria e Vanni, 2010).

Em nossa amostra encontramos um total de 725 CNVs comuns a duas ou mais amostras, excluindo-se as observadas no indivíduo controle, restaram 703 regiões com variações, demonstradas no Quadro 2, aproximadamente 97% das CNVs se apresentando em amostras patológicas, concordante com o estudo de Liu *et al.* (2013) que encontrou 464 CNVs. No intuito de tentar encontrar fatores que expliquem tamanha variação, encontramos a descrição do evento denominado *chromotripsis*, que é o fenômeno pelo qual se produzem alterações e reordenamentos cromossômicos maciços, verdadeira quebra e posterior reordenamento do genoma após um só evento que explica a grande heterogeneidade genômica nos diferentes tipos tumorais (Meyerson e Pellman, 2011; Jones e Jallepalli, 2012), sendo que nesses pacientes os tumores são mais agressivos. O gene *TP53* tem importante papel na correção das áreas alteradas, assim se o indivíduo tiver alteração na expressão do *TP53* terá chances de desenvolver um padrão mais agressivo (Molenaar *et al.*, 2012; Pikor *et al.*, 2013). O que pudemos evidenciar foi a alta prevalência de deleções no cromossomo 17 nas diversas patologias comparadas, no entanto nos pacientes com carcinoma folicular apenas a paciente T14, que era portadora da forma mais agressiva do tumor, tem alterações nesta com inversão, ou seja, taxas de amplificação do braço longo cromossomo 17 (95,78%) e é a única dentre os 4 pacientes com doença folicular que apresenta alteração nesta região cromossômica. Alguns trabalhos apontam que ganhos em 17q favorecem proto-oncogenes, como HER2 e ERBB2, em certos tipos de cânceres, como mama e sistema nervoso, apresentando um quadro similar à perda de 17p, conseqüentemente do TP53 (Abel *et al.*, 1999; Arslantas *et al.*, 2003). Por outro lado, a ocorrência de deleção de 17p nos outros pacientes pode ter propiciado a ocorrência da *chromotripsis* pela inativação do TP53, fato associado a uma maior instabilidade genômica (Brusa *et al.*, 2003; Wendel *et al.*, 2006). Nestes pacientes com

deleções do braço curto do cromossomo 17 pode ter havido a perda do TP53 propiciando a chromotripsis.

No Quadro 3, que representa de forma comparativa as distribuições de ampliações e deleções entre adenomas e carcinomas foliculares, é possível observar que o cromossomo 19 é um dos mais afetados em adenomas, sendo a deleção a maior alteração (76,03% do cromossomo é comprometido, nas regiões 19p13.3 e 19q13.2). Alguns achados citogenéticos em hiperplasias benignas da tireoide, envolviam translocações do cromossomo 19 com os cromossomos X e 22 como únicas alterações, e foi sugerido que a região distal de 19q seria importante no desenvolvimento de adenomas da tireoide (Belges *et al.*, 1992; Dal Cin *et al.*, 1992).

A relação de alterações do cromossomo 19 com neoplasias pode ser também via perturbações no controle do ciclo celular, visto que codifica a ciclina E1 (CCNE1) localizada no 19q12. Alterações nesse gene foram observadas em 76% de carcinomas papilíferos de tireoide, mas normalmente correspondem a ampliações (Kondo *et al.*, 2006).

Apesar de alterações de 19p13.3 representarem as alterações mais comuns em tumores epiteliais, os mecanismos moleculares ligados a esse fato continuam obscuros. Foi sugerido que essa alteração tenha algum tipo de relação com o estímulo ao crescimento invasivo atribuído a alguns miRNAs do C19MC, a partir de um fenômeno epigenético (Bullerdiek e Flor, 2012; Flor e Bullerdiek, 2012).

Uma análise mais aprofundada dos dados obtidos no presente estudo possibilitou destacar as alterações mais frequentes em cada tipo patológico, reduzindo as CNVs para 18. Nenhuma das alterações encontradas nos pacientes portadores de patologia foi observada no paciente normal (controle).

Das 18 regiões, apenas duas, a 8p22 (já descrita anteriormente) e a 12p13.33-p13.32 (onde encontra-se o gene *CCND2* afetado que codifica a ciclina D2, cuja atividade é necessária para a transição do ciclo celular de G1/S), mostraram exclusividade para carcinomas foliculares. Ressaltamos aqui o fato de ambas alterações não estarem presentes nos pacientes analisados por a-CGH e descritos por Souza (2014), que estudou pacientes com o tipo papilífero clássico (4 pacientes) e variante folicular (4 pacientes). Observamos que a alteração do cromossomo 8 esteve presente tanto na forma invasiva quanto na minimamente invasiva, já a amplificação do cromossomo 12 não está presente no indivíduo T100, que é do sexo masculino, o que poderia demonstrar um padrão de apresentação diferente entre homens e mulheres. Infelizmente, o pequeno número de amostras de pacientes do sexo masculino dificulta esse tipo de comparação.

Outras duas regiões alteradas, 5q13.1 (onde encontram-se alteração do gene *PIK3R1* responsável pela coordenação de diversas funções celulares, incluindo proliferação, sobrevivência, degranulação celular, tráfico vesicular e migração celular) e 22q11.21-q11.22, foram observadas em carcinomas bem diferenciados, mas não em adenomas e doenças benignas, podendo ser uma via na evolução tumoral.

Oito regiões pareceram seguir por uma linha de formação tumoral específica, indo de hiperplasia para adenoma folicular e de adenoma para carcinoma papilífero, mas não para carcinoma folicular, discordantes da proposta de Qureshi *et al.* (2013), que procurou demonstrar uma sequência evolutiva iniciando com alterações dos adenomas, progredindo para carcinoma folicular minimamente invasivo até invasivo.

Por fim, seis regiões apresentaram alterações inversas, com ampliações em carcinomas foliculares e deleção em adenomas, este último também seguindo a linha

para carcinoma papilíferos. Nesse último caso ,novamente, temos a proposta de um padrão de evolução de adenoma para carcinoma papilífero.

Perante o exposto ,podemos sugerir que, apesar do grande número de alterações genômicas encontradas, o que já era esperado na análise de células neoplásicas devido à instabilidade genômica que se instala, duas alterações que foram exclusivas para o carcinoma folicular, nos cromossomos 8 e 12,devem ser estudadas mais profundamente como candidatas a marcadores desse tipo tumoral. O fato dessas regiões codificarem genes responsáveis pela transição do ciclo celular de G1/S e genes que exercem controle e checagem do material genético, além de genes supressores a ativadores de procarcinógenos, nos leva a apontar estas duas regiões como prováveis participantes do processo evolutivo de carcinomas foliculares.

Considerando as dificuldades de diagnóstico deste tipo tumoral ,que chegam a 80% de falsos positivos ,a confirmação destes dois marcadores moleculares pode tornar o tratamento das doenças malignas da tireoide mais eficiente e menos invasivo. Assim, o desenvolvimento de sondas região-específicas para essas duas alterações, processo facilmente alcançável pelo uso de BACs e aplicação das mesmas em material obtido por PAAF de pacientes com essa doença, deveria ser considerado como o próximo passo para verificação e validação dos achados no uso diagnóstico, em combinação com os métodos já utilizados.

V- CONCLUSÃO

- 1- Utilizando-se o método a CGH, foram encontradas 17 regiões com possível relevância para o desenvolvimento tumoral de carcinomas foliculares, localizadas nos cromossomos 3, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 17, 18 e 19.
- 2- Os adenomas foliculares apresentam padrão de amplificação maior em pacientes mais jovens e deleções em pacientes mais velhas, mostrando uma evolução da lesão com o aumento da idade.
- 3- As regiões alteradas nos adenomas foliculares são aquelas que incluem genes responsáveis pela codificação do TP53 e apolipoproteínas ,enquanto os do carcinoma folicular são os responsáveis por todo aparato genético (tradução, transcrição, defesa), crescimento e morte celular.
- 4- Nos carcinomas as taxas de amplificação e deleção são muito semelhantes.
- 5- Os carcinomas foliculares da amostra apresentaram padrão de amplificação exclusivas do cromossomo 8, na região 8p22, e do cromossomo 12 ,na região 12p13.33-p13.32 , que podemos considerar como marcador tumoral.
- 6- O paciente masculino com carcinoma folicular não apresentou amplificação do cromossomo 12 e também apresentou um padrão de alterações, amplificação e deleções, maior que os outros pacientes, evidenciando um comportamento mais anárquico do tumor e provável via diferenciada daquela observada no sexo feminino.
- 7- Os resultados apontam para uma linha de formação tumoral evolutiva, indo da hiperplasia para o adenoma folicular e, posteriormente, para carcinoma papilífero .
- 8- As regiões que apresentam deleções em adenomas foliculares seguem a linha para carcinomas papilíferos ,mas têm padrão inverso nos carcinomas foliculares , tornando

possível dizer que os carcinomas foliculares não são uma progressão dos adenomas foliculares.

9- Os carcinomas foliculares são uma patologia que apresenta uma linha evolutiva diferente dos outros tumores da tireoide, com ampliações específicas que podem surgir como marcadores tumorais .

VI – REFERÊNCIAS

- ABEL, F et al. (1999). Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavourable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2 (*SSTR2*) gene at 17q24. **Br J Cancer** 81(8): 1402–1409.
- ALVI, MM et al. (2009). Marcadores de riesgo de neoplasia folicular en nódulos tiroideos. **Medicina (B. Aires)**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires 69 (5).
- AMAN, P (1999). Fusion genes in solid tumors. **Semin Cancer Biol**, 9 (4): 303-18.
- AOYAMA, H et al. (2003). Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quím. Nova**, São Paulo 26 (6).
- ARSLANTAS, A et al. (2003). Comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in benign, atypical and anaplastic meningiomas. **Acta Neurol Belg** 102, 53-62.
- BELGE, G et al (1996). Deletions of the short arm of chromosome 2 characterize a new cytogenetic subgroup of benign thyroid tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 16 (2):149-51.
- BERTRAM, JS (2000). The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med** 21(6): 167-223.
- BIANCO, AC, KIMURA, ET (1999). **Fisiologia da glândula tireóide**. In: AIRES, M.M. (Ed.) Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- BOCKMUHL, U et al (1998). Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. **Head Neck** 20 (2):145-51.
- BRASSARD, M. et al (2011). Long-term follow-up of patients with papillary and follicular thyroid cancer: a prospective study on 715 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 96 (5): 1352-9.
- BREIVIK, J (2005). The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Semin Cancer Biol** 15 (1): 51-60.
- BRUNAUD, L. et al (2003). Chromosomal aberrations by comparative genomic hybridization in thyroid tumors in patients with familial nonmedullary thyroid cancer. **Thyroid** 13 (7): 621-9.
- BRUSA, G et al., (2003). p53 loss of function enhances genomic instability and accelerates clonal evolution of murine myeloid progenitors expressing the p(210)BCR-ABL tyrosine kinase. **Haematology** 88 (6): 622-630.
- BULLERDIEK J, FLOR, I (2012). Exosome- “9” sis. **Molecular Cytogenetics** 5:27.

- CAI, L et al (2000). A 500-kb region on chromosome 16p13.1 contains the pseudoxanthoma elasticum locus: high-resolution mapping and genomic q structure. **J Mol Med** 78 (1): 36-46.
- CARIA, P, VANNI, R (2010). Cytogenetic and molecular events in adenoma and well-differentiated thyroid follicular-cell neoplasia. **Cancer Genet Cytogenet** 203 (1): 21-29.
- CASTRO, P et al (2005). Adenomas and follicular carcinomas of the thyroid display two major patterns of chromosomal changes. **J Pathol**, v. 206, n. 3, p. 305-11
- CHAGAS, JFS et al (2008). Multicentricidade no carcinoma diferenciado da tireóide. **Re. Bra. Otorrinolaringol**, São Paulo 75 (1).
- CHIAPPETTA, G et al (2002). The RET/PTC oncogene is frequently activated in oncocyctic thyroid tumors (Hurthle cell adenomas and carcinomas), but not in oncocyctic hyperplastic lesions. **J Clin Endocrinol Metab** 87 (1): 364-9.
- CRIADO, B et al (1995). Detection of numerical alterations for chromosomes 7 and 12 in benign thyroid lesions by in situ hybridization. Histological implications. **Am J Pathol** 147 (1):136-44
- DAL CIN P et al (1992). Involvement of 19q13 in follicular thyroid adenoma. **Cancer Genet Cytogenet** 60(1):99-101
- DAVIES, JJ et al (2005). Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. **Chromosome Res** 13 (3):237-48.
- DEY, P (2004). Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. **J Clin Pathol**, 57 (12): 1245-9.
- FINN, S et al (2007). Low-level genomic instability is a feature of papillary thyroid carcinoma: an array comparative genomic hybridization study of laser capture microdissected papillary thyroid carcinoma tumors and clonal cell lines. **Arch Pathol Lab Med** 131:65–73.
- FLOR I, BULLERDIEK J (2012). The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours. **J Pathol** 2012. 227(3):270-4.
- FREEMAN, JL (2006). Copy number variation: new insights in genome diversity. **Genome Res** 16 (8): 949-61.
- FRENCH, CA et al (2003). Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. **Am J Pathol**, v. 162, n. 4, p. 1053-60.
- GERHARD, R. et al (2010). NDRG1 protein overexpression in malignant thyroid neoplasms. **Clinics (Sao Paulo)**, 65 (8):757-62.

- GIL, AB (2006). Factores Genéticos de susceptibilidad al cáncer de tiroides y riesgo genético del tratamiento con 131 Iodo. Tese de Doutorado, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanha, 191 pgs.
- GOLLIN, SM (2005). Mechanisms leading to chromosomal instability. **Semin Cancer Biol** 15 (1):33-42.
- GOODISON, S et al. (2005). Molecular cytogenetic analysis of a human breast metastasis model: identification of phenotype-specific chromosomal rearrangements. **Cancer Genet Cytogenet** 156 (1): 37-48.
- GUIMARAES, DA et al (2009). Assessment of hypercoagulability markers and lipid levels in postmenopausal women undergoing either oral or transdermal hormone replacement therapy. **J Thromb Thrombolysis** 27 (2):135-40.
- GUNTER, C. The molecular genetics of cancer: down the rabbit hole. **Hum Mol Genet** 10 (7): 655-6.
- HANAHAN, D, WEINBERG, RA (2000). The hallmarks of cancer. **Cell** 100 (1): 57-70.
- HEMMER, S et al (1999). DNA copy number changes in thyroid carcinoma. **Am J Pathol** 154 (5):1539-47.
- HERRMANN, M (2003). Standard and molecular cytogenetics of endocrine tumors. **Am J Clin Pathol** 119:S17-38.
- HOLLSTEIN, M et al(1991). p53 mutations in human cancers. **Science** 253 (5015): 49-53.
- JENKINS, RB et al (1990). Frequent occurrence of cytogenetic abnormalities in sporadic nonmedullary thyroid carcinoma. **Cancer** 66 (6): 1213-20.
- JONES, MJ, JALLEPALLI, PV (2012). Chromothripsis: chromosomes in crisis. **Dev Cell** 23 (5): 908-17.
- KATO, MA, FAHEY, TJ (2009). Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. **Surg Clin North Am** 89 (5): 1139-55.
- KNOBEL, M et al (2001). Genética molecular do hipotireoidismo congênito. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo 45 (1).
- KLEIHUES, P. et al (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol** 61 (3): 215-25.
- KONDO, T et al (2006). Pathological mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. **Nature Reviews** 6:292-305.
- LIU, Y et al (2013). DNA copy number variations characterize benign and malignant thyroid tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 98 (3): E558-66

- LOPEZ, T. et al (2008). Thermal phase stability and catalytic properties of Nanostructured TiO₂-MgO sol-gel mixed oxides. **J Nanosci Nanotechnol** 8 (12): . 6608-17.
- MACIEL, RM, KIMURA, ET, CERUTTI, JM (2005). Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular)]. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 49 (5): . 691-700.
- MATSUO, SE et al (2003). Activin betaB expression in rat experimental goiter and human thyroid tumors. **Thyroid** 13 (3): 239-47.
- MESSINA, RL et al (2012). Reactivation of p53 mutants by prima-1 [corrected] in thyroid cancer cells. **Int J Cancer** 130 (10):2259-70.
- MEYERSON, M. PELLMAN, D (2011). Cancer genomes evolve by pulverizing single chromosomes. **Cell** 144 (1):9-10.
- MITELMAN, F et al (1997a). Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 95 (1):1-8.
- MITELMAN, F et al (1997b). Cytogenetic diagnosis of tumors. Clinical significance of chromosome aberrations **Lakartidningen** 94 (24): 2277-81.
- MITELMAN, F (2000). Recurrent chromosome aberrations in cancer. **Mutation Res** 462 (2-3): 247-253.
- MIURA, D et al (2003). Anaplastic thyroid cancer: cytogenetic patterns by comparative genomic hybridization. **Thyroid** 13 (3): 283-90.
- MOLENAAR, JJ et al (2012). Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. **Nature** 483 (7391):589-93.
- MOYANO, L et al (2004). [HBME-1 and cyclin D1 as diagnostic markers for follicular thyroid carcinoma]. **Rev Med Chil** 132 (3):279-84.
- OBARA, K et al (2001). Evaluation of myc and chromosome 8 copy number in colorectal cancer using interphase cytogenetics. **Int J Oncol** 18 (2): 233-9.
- OHORI NP et al (2010). Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle “ollicular lesion of undetermined significance/atypia of” **Cancer Cytopathol** 118:17–23.
- OUYANG, B et al (2002). Mechanisms of aneuploidy in thyroid cancer cell lines and tissues: evidence for mitotic checkpoint dysfunction without mutations in BUB1 and BUBR1. **Clin Endocrinol** 56 (3):341-50.

- PATEL, AS et al (2000) Cytogenetics and cancer. **Current Opinion in Oncology**,12(1):62-67.
- PERISSEL, B et al (2000). Structural and numerical aberrations of chromosome 22 in a case of follicular variant of papillary thyroid carcinoma revealed by conventional and molecular cytogenetics. **Cancer Genet Cytogenet** 121 (1): 33-7.
- PIEROTTI, MA et al (1996). Cytogenetics and molecular genetics of carcinomas arising from thyroid epithelial follicular cells. **Genes Chromosomes Cancer** 16(1): 1-14.
- PIKOR, L et al (2013). The detection and implication of genome instability in cancer. **Cancer Metastasis Rev** 32 (3-4): 341-52.
- PINEDA, P et al (2003). [Detection of malignancy markers in thyroid nodules by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)]. **Rev Med Chil** 131(9):965-72.
- PINKEL, D, ALBERTSON, DG (2005a). Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. **Nat Genet** 37: S11-7.
- PINKEL, D, ALBERTSON, DG (2005b). Comparative genomic hybridization. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 6: 331-54.
- QIN, LX (2002). Chromosomal aberrations related to metastasis of human solid tumors. **World J Gastroenterol** 8 (5): 769-76.
- QURESHI, AA et al (2013). Genomic differences in benign and malignant follicular thyroid tumours using 1-Mb array-comparative genomic hybridisation. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 270 (1): 325-35.
- RABBITTS, TH (1994). Chromosomal translocations in human cancer. **Nature** 372 (6502): 143-9.
- RAJAGOPALAN, H, LENGAUER, C (2004). Aneuploidy and cancer. **Nature** 432 (7015): 338-41.
- ROBENSHTOK, E et al (2011). Clinical characteristics and outcome of familial nonmedullary thyroid cancer: a retrospective controlled study. **Thyroid** 21 (1):43-8.
- ROQUE, L et al (1998). Follicular thyroid carcinoma: chromosome analysis of 19 cases. **Genes Chromosomes Cancer** 21 (3): 250-5.
- SAMBROOK, J et al (1989). **Molecular cloning**. Vol. 2. New York: Cold spring harbor laboratory press.

- SANDBERG, AA (1994). Cancer cytogenetics for clinicians. **Cancer J Clin** 44 (3):136-59.
- SCHWAB, M (1999). Oncogene amplification in solid tumors. **Semin Cancer Biol**, 9 (4):319-25.
- SHACKNEY, SE, SHANKEY, TV (1997). Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. **Cytometry** 29 (1):1-27.
- SINGH, B et al (2000). Screening for genetic aberrations in papillary thyroid cancer by using comparative genomic hybridization. **Surgery** 128 (6):888-93.
- SOUZA, MPC (2014). Análise da Ocorrência de Variação do Número de Cópias no Genoma de Carcinomas Papilíferos da Tireoide. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFPA, Belém,PA.
- STOLER, DL et al (2007). Comparative genomic instabilities of thyroid and colon cancers. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 133 (5): 457-63.
- TIBILETTI, MG (2004). Specificity of interphase fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. **Cancer Genet Cytogenet** 155 (2):143-8.
- UNGER, K et al (2008). Array CGH demonstrates characteristic aberration signatures in human papillary thyroid carcinomas governed by RET/PTC. **Oncogene** 27 (33): 4592-602.
- VARELLA-GARCIA, M (2003). Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. **Oncologist** 8 (1): 45-58.
- WANG, N (2002). Methodologies in cancer cytogenetics and molecular cytogenetics. **Am J Med Genet** 115 (3): 118-24.
- WARD, LS et al (2006). Low-risk differentiated thyroid carcinoma. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 50 (3):550-7.
- WOODRUFF, SL et al (2010). Global variation in the pattern of differentiated thyroid cancer. **Am J Surgery** 200 462–466.
- YIP, L et al (2010). Summary statement: utility of molecular marker testing in thyroid cancer. **Surgery** 148:1313–1315