



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**EXPRESSÃO DO FOXP3 NO CARCINOMA
PAPILÍFERO DA TIROIDE ASSOCIADO OU NÃO À
TIROIDITE DE HASHIMOTO.**

Murilo Pedreira Neves Junior

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

N518 Neves-Junior, M P

Expressão do FOXP3 no carcinoma papilífero da tireoide associado ou não à tireoidite de Hashimoto/Murilo Pedreira Neves Junior – Salvador: M. P. Neves -Junior, 2012.

56p. il.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Medicina.

1. Carcinoma; 2. Tireoidite; 3. Imunoistoquímica; 4. Carcinoma papilífero
I. Título.

CDU: 616-006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**EXPRESSÃO DO FOXP3 NO CARCINOMA
PAPILÍFERO DA TIROIDE ASSOCIADO OU NÃO À
TIROIDITE DE HASHIMOTO.**

Murilo Pedreira Neves Junior

Professor-orientador: Edgar Marcelino de
Carvalho

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de **Doutor** em Medicina.

Salvador (Bahia), 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

Fundada em 18 de Fevereiro de 1808

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Largo do Terreiro de Jesus, s/n – Pelourinho

40026-010 Salvador, Bahia, Brasil

Telfax: (55) (71) 3283-5582 – 3283-5567

www.fameb.ufba.br

pos.saude@ufba.br



ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

1 Aos 17 dias do mês de dezembro de 2012, no horário das 09:00 horas, nas dependências do
2 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da
3 Universidade Federal da Bahia, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da tese
4 intitulada "CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE ASSOCIADO À TIREOIDITE DE
5 HASHIMOTO" apresentada pelo pós-graduando Murilo Pedreira Neves Júnior. A Comissão
6 Examinadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
7 conforme o que estabelecem o Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação da
8 Universidade Federal da Bahia e o Regimento do Programa de Pós-graduação em Ciências da
9 Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por: Prof. Dr. Moysés Sadigursky,
10 Doutor em Patologia Humana – UFBA (Presidente); Prof. Dr. Paulo Roberto Lima Machado,
11 Doutor em Medicina – UFBA; Prof. Dr. Sérgio Marcos Arruda, Doutor em Patologia Humana –
12 Fiocruz-Ba; Prof. Dr. Roque Pacheco Almeida, Doutor em Imunologia – UFS; Profª. Dra.
13 Selma Maria Bezerra Jerônimo, Doutora Ciências Biológicas – UFRN e Prof. Dr. Edgar
14 Marcelino de Carvalho (orientador), Doutor em Medicina e Saúde (suplente). Após a
15 apresentação da tese, a Comissão Examinadora realizou a arguição que foi respondida
16 satisfatoriamente (satisfatoriamente ou insatisfatoriamente) pelo doutorando. A tese
17 apresentada foi considerada aprovada (aprovada ou reprovada). E, para constar do
18 processo de conclusão de curso e de colação de grau¹, a Comissão Examinadora lavrou a
19 presente Ata que é assinada por todos os seus membros. A Comissão Examinadora aprova a
20 dissertação:

- 21 [X] Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da dissertação.
22 () Sem recomendações de modificações da versão final.

23 Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de
24 modo a ser concluído o processo de outorga do título de doutor.

25 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

26
27 [Signature] Moysés Sadigursky (Presidente)
28 [Signature] Paulo Roberto Lima Machado
29
30 [Signature] Roque Pacheco Almeida
31
32 [Signature] Selma Maria Bezerra Jerônimo
33
34 [Signature] Sérgio Marcos Arruda
35
36 [Signature] Edgar Marcelino de Carvalho (Suplente)
37
38

39 Ata Aprovada na Sessão do dia 17/12/2012

40 ¹ A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do
41 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, de quatro exemplares da dissertação, acompanhados
42 de 7 versões completas em meio eletrônico (formato pdf) no prazo máximo de 60 dias.

I. INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

➤ Faculdade de Medicina da Bahia

HOSPITAL SÃO RAFAEL

II. FONTES DE FINANCIAMENTO

Fontes de Financiamento:

1. Serviço de Imunologia UFBA

SUMÁRIO

I. Instituições participantes	3
II. Fontes de financiamento	4
III. Índice de figuras, gráficos e tabelas.	6
IV Índice de abreviaturas	7
V. Resumo	9
VI. Objetivos	10
VII. Introdução	11
VIII. Materiais e métodos	30
IX. Resultados	33
X. Discussão	41
XI. Propostas do estudo	47
XII. Conclusões	47
XIII. Summary	48
XIV. Referências bibliográficas	49
XV. Anexos	56

III. ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

FIGURA I. Aspectos patológicos da Tireoidite Hashimoto.	13
FIGURA 1. Fluxograma das 1438 tireoidectomias com 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide.	31
FIGURA 2. Frequência de Tireoidite Hashimoto em 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide.	33
FIGURA 3. Frequência de expressão de FOXP3 em 29 casos Carcinoma Papilífero da Tireoide com e sem Tireoidite de Hashimoto.	37
FIGURA 4. Imunoistoquímica com marcador de FOXP3:	39

TABELAS

TABELA 1. Aspectos demográficos e histológicos de 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide.	34
TABELA 2 Distribuição dos 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide com e sem Tireoidite de Hashimoto em relação a gênero, idade e variantes histológicas.	35
TABELA 3. Características demográficas, de frequência de Tireoidite de Hashimoto e de expressão de FOXP3 do subgrupo de 29 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide submetidos a exame imunoistoquímico.	36
TABELA 4. Análise do gênero, da frequência e do tipo de expressão de FOXP3 na análise Imunoistoquímica em 29 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide com e sem TH.	38

IV. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

B7-H1 Proteína da família B7 atua como coestimulante da proliferação de células T e da secreção de interleucina 10.

BRAF Gen humano responsável pela produção da proteína B-Raf que está envolvida nos mecanismos de proliferação celular.

FASL Proteína da membrana celular relacionada com apoptose.

Galectina-3 Proteína da superfície celular implicada na inter-relação célula a célula quimiotaxia e crescimento celular.

HBME-1 Anticorpo monoclonal, dirigido contra um epítipo desconhecido, que era inicialmente utilizada como marcador de células mesoteliais e se mostra presente no câncer da tireoide.

IL-2 Citocina relacionada com a resposta imune natural e a discriminação de antígenos próprios

MYC Gene regulador localizado no cromossomo oito cuja mutação está relacionada a várias neoplasias malignas

PAAF Punção aspirativa por agulha fina

P53 Proteína citoplasmática que quando mutada se mostra presente em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos.

p63 Proteína tumoral membro da família p53 relacionada à proliferação celular, é útil em imunomarcagem de neoplasias.

RAS Proto oncogene mais frequentemente encontrada em tumores espontâneos da tireoide.

RET Proto oncogenes cuja mutação se relaciona com câncer da tireoide

RET/PTC Rearranjo cromossômico que gera ativação do RET e o desenvolvimento do câncer da tireoide.

SKP-2 Gene codificador de proteína skp-2 relacionada a patogênese de linfomas e câncer da mama

TGF-B Fator de transformação do crescimento beta é uma proteína que controla a proliferação e a diferenciação celular. Desempenha papel no sistema imune e na carcinogênese como fator antiproliferativo.

Treg Células T CD4-positivas que inibem as doenças autoimunes através da modulação da atividade de outras células da resposta imune celular.

TTF-1 Fator de transcrição da tireoide 1 é uma proteína nuclear expressa durante o desenvolvimento da tireoide, do pulmão e algumas regiões cerebrais.

V. RESUMO

EXPRESSÃO DO FOXP3 NO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREOIDE ASSOCIADO OU NÃO À TIROIDITE DE HASHIMOTO.

Introdução: Tumores da tiróide são endócrinopatias comuns na população entre 20 e 60 anos. O FOXP3 é um membro da família de reguladores da transcrição que está envolvida na regulação do desenvolvimento e função do sistema imune. Esta expresso em células normais linfóides e em células neoplásicas de vários tecidos como pulmão, mama, cólon, melanoma e leucemias, este estudo tem o objetivo de identificar a presença do FOXP3 no carcinoma papilíferos da Tireoide

Metodologia Foi realizado um estudo de série de casos coletados no período de 2000 a 2008, quando foram realizadas 1438 tiroidectomias totais no Serviço de Cirurgia do Hospital São Rafael, Salvador, Bahia. Destes casos, foram selecionados aqueles com diagnóstico de carcinoma papilíferos da Tireoide, perfazendo um total de 466 casos, dos quais foram coletadas informações demográficas de prontuários eletrônicos do hospital. Foi realizada revisão das lâminas para classificação dos subtipos histológicos do carcinoma papilíferos da Tireoide e identificação de tireoidite de Hashimoto. Os dados foram dispostos em banco de dados para análise estatística. Posteriormente, foram randomicamente selecionadas 30 casos de CPT para fins de exame imunoistoquímico com o anticorpo contra FOXP3.

Resultados: Dos 29 casos submetidos ao exame de imunoistoquímica observou-se que 23 (79.3%) casos eram do sexo feminino e seis (20.7%) eram do sexo masculino. A média de idade foi de 42 anos. 18 pacientes (62.1%) foram diagnosticados apenas com CPT e 11 (37.9%) tinham TH concomitante. A marcação positiva para FOXP3 na imunoistoquímica esteve presente em 21 (72.4%) de todos os casos analisados

Conclusão: O FOXP3 apresentou alta positividade no carcinoma papilíferos da Tireoide. Não houve diferença com relação coexistência de tireoidite de Hashimoto ou não.

Palavras-chaves: Tireoidite, carcinoma papilífero da Tireoide, FOXP3, Imunohistoquímica, tireoidite de Hashimoto.

VI. OBJETIVOS

PRINCIPAL

1. Avaliar a expressão do FOXP3 no Carcinoma papilífero da tireoide associado ou não a Tireoidite de Hashimoto.

SECUNDÁRIOS

1. Avaliar a associação do Carcinoma papilífero da tireoide da tireoide com a Tireoidite de Hashimoto.
2. Comparar os aspectos demográficos do Carcinoma papilífero da tireoide da Tireoide com e sem associação à Tireoidite de Hashimoto.
3. Avaliar a relação da Tireoidite de Hashimoto com os subtipos do Carcinoma papilífero da tireoide.

VII. INTRODUÇÃO

Tireoidite de Hashimoto.

A Tireoidite de Hashimoto (TH) é a doença autoimune da tireoide mais prevalente, onde se observa infiltração de células em especial de linfócitos por vezes intensa e que é muitas vezes seguida por destruição gradual do tecido parenquimatoso da tireoide e substituição por fibrose¹. A TH tem uma taxa de prevalência de 1 a 4% e a incidência de 30-60/100.000 na população por ano, sendo mais comum em mulheres². A incidência de TH tem aumentado nos últimos anos e tornou-se 10 vezes mais comum do que era até o início de 1990. Este aumento da incidência tem sido associado à ingestão de iodo em excesso, particularmente em áreas costeiras².

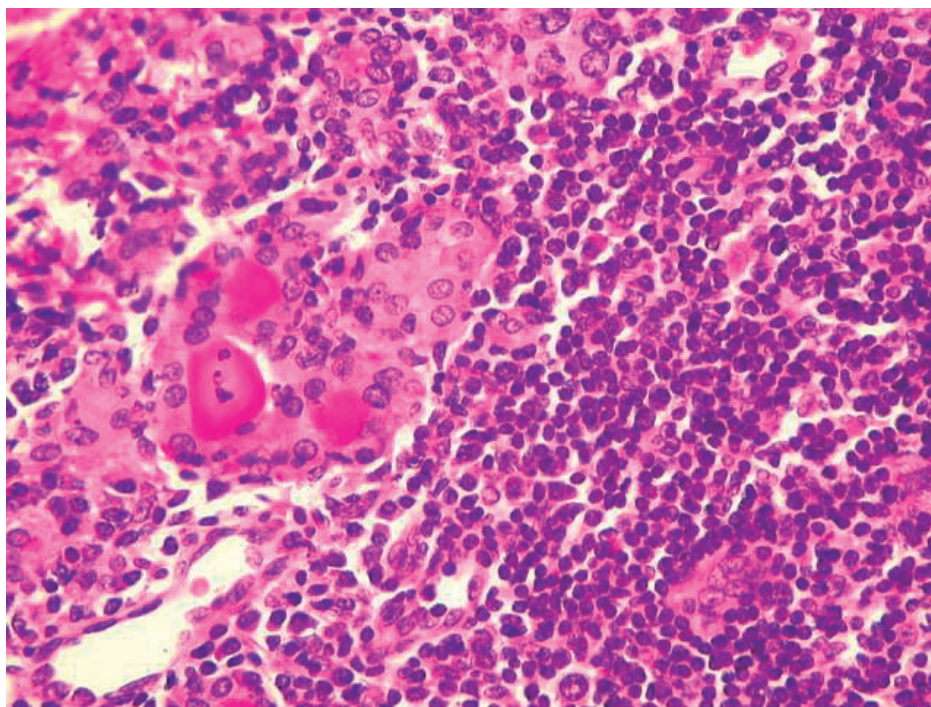
A TH esta relacionada à ativação da resposta imune celular e humoral com ativação anormal de linfócitos T e consequente destruição de células epiteliais da tireoide por quimiotaxia de linfócitos com produção de autoanticorpos e resposta inflamatória crônica persistente³. A destruição das células pode ser compensada parcialmente pelo aumento do hormônio estimulador da tireoide (TSH) e da hiperplasia das células epiteliais restantes³. A principal característica imunológica detectada na doença é a presença de auto-anticorpos anti-tireóidanos no soro dos pacientes contra dois antígenos da tireoide, tireoperoxidase e tiroglobulina. Os auto-anticorpos estão presente em cerca de 90% dos pacientes¹. Existem evidências de que ambos os anticorpos tenham papel importante na patogênese da TH assim como a citotoxicidade mediada por células T e as vias de ativação apoptóticas .

A patogênese de HT tem sido objeto de numerosos estudos, ao longo das últimas décadas. O desenvolvimento de destruição autoimune e insuficiência de folículos da tiroide é um processo que inclui várias etapas envolvendo diversos fatores convergentes ambientais e genéticos. O fator principal no desenvolvimento de tireoidite autoimune é a perda da tolerância imune iniciada por eventos inflamatórios na glândula, provavelmente como

resultado de infecções virais ou bacterianas com lesão das células da tiroide que poderiam expor epitopos novos ou desmascarar novos epitopos resultando em um influxo de células dendríticas e macrófagos apresentadores de antígeno histocompatibilidade (MHC) de classe II. Estas células apresentariam antígenos tireoidianos para linfócitos dentro dos nódulos linfáticos regionais, levando a expansão clonal de células T CD4 + autorreativas, células T CD8 +, células T citotóxicas, e células B produtoras imunoglobulinas (IgG). Estas células infiltram o tecido tireoidiano resultando em tireoidite crônica³.

O quadro histológico da TH (Figura I) caracteriza-se por intenso infiltrado linfoide com grande número de folículos, muitos deles com centros germinativos claros e áreas de tecido conjuntivo fibroso denso colagenizado. Há também hiperplasia de células oxifílicas associada à hiperplasia epitelial folicular por vezes constituindo ninhos sólidos de células epiteliais de significado ainda não esclarecido^{1, 2}. Foram descritas fissuras no tecido que são, na verdade, principalmente vasos linfáticos dilatados, localizados nos septos interlobulares próximo aos folículos linfoides¹. O processo inflamatório crônico leva lentamente a destruição do tecido folicular normal.

Figura I Aspectos patológicos da TH.



Presença de intenso infiltrado inflamatório crônico associado a agrupamentos de células epiteliais com alterações nucleares. Coloração HE aumenta de 400X.

A doença tem risco estimado anual de 4% em mulheres, pode apresentar-se com uma variedade de manifestações que vão de uma função tireoidiana normal associado à presença de auto-anticorpos até o desenvolvimento de disfunção tireoidiana grave^{1, 2}. Alguns pacientes apresentam curtos períodos de tireotoxicose leve que pode desaparecer espontaneamente. Na maioria das vezes, a apresentação inicial acontece na fase eutireoidea seguida por desenvolvimento gradual de hipotireoidismo subclínico que progride lentamente para hipotireoidismo sintomático¹.

A associação entre o carcinoma papilífero da tireoide (CPT) e a TH é intensamente questionada na comunidade científica por compartilharem várias características morfológicas, imunohistoquímica e moleculares⁴. Estudos têm sido realizados buscando demonstrar a associação entre essas duas doenças e tem sugerido uma relação não apenas

incidental⁵. Os pacientes com CPT tiveram quatro vezes mais propensão a demonstrar uma TH coexistente, em comparação com os pacientes com outras doenças da tireoide, sugerindo uma ligação entre a inflamação crônica e o aparecimento de câncer na glândula tireoide⁶.

Existem evidências indiretas que suportam a associação da TH com o CPT, como o aumento de 2,7 vezes da frequência da TH associada ao CPT quando comparada ao grupo controle⁶. Admite-se que a presença de processo inflamatório crônico observado na TH poderia ser o fator desencadeante, no qual a ativação de genes ou de receptores ligados ao ciclo celular poderiam ser os fatores de transformação maligna^{7,8}.

O rearranjo cromossômico RET/PTC (fusão do RET tirosinacina-5 na região terminal de genes heterogêneos) é um mecanismo fundamental para a ativação de oncogenes de células foliculares da tireoide induzindo a transformação neoplásica. Este rearranjo tem sido encontrado em até 68% dos tecidos de tireoide de pacientes com TH¹⁰. O RET/PTC leva à expressão de uma proteína quimérica que é considerada com marcador genético do CPT e poderia ser responsável pela quimiotaxia que levaria a infiltração dos tecidos por monócitos e linfócitos^{10, 11}. Pacientes que foram expostos à radiação atômica, como observado em Chernobyl na atual Rússia, desenvolveram não apenas RET/PTC com carcinoma papilar subsequente, mas também a TH¹².

Outro importante fator é a frequente detecção de p63 na TH e no câncer da tireoide em contraste com a detecção incomum de pacientes com outros cânceres e doença de Graves. Isso leva a proposição de que essas duas doenças são iniciadas por células-tronco pluripotentes residuais que expressam positividade para p63^{8, 11, 12}. Embora seja conhecida a relação entre TH e CPT há poucos dados relativos à TH como fator prognóstico para esta associação⁶.

As razões da existência da associação entre o CPT e a TH permanecem ainda não esclarecidas. Estudos recentemente publicados mostraram uma maior incidência de CPT

em pacientes com TH e uma maior prevalência também de TH em pacientes com CPT^{6, 7, 13,14}. O CPT coexistindo com TH foi mais frequentemente observado em pacientes mais jovens e do sexo feminino e existem dados contraditórios que sugerem um efeito protetor da TH em pacientes com CPT⁶ bem como uma correlação favorável entre o TH em pacientes com CPT e sobrevida livre de doença e também a sobrevida global. Eles concluíram que os pacientes com CPT, na presença de TH, tiveram um resultado clínico mais favorável provavelmente por diagnóstico concomitante de PTC em fase inicial do PTC. A TH coexistindo com CPT estava associada a fatores de melhor prognóstico, tais como menor tamanho do tumor, menor incidência de metástases linfonodais^{6, 8,9}. Além disso, foi observado que pacientes com CPT e TH tendem a ter um curso mais indolente do que aqueles com CPT apenas, incluindo menores taxas de recorrência da neoplasia¹⁴.

Em um estudo retrospectivo com uma grande casuística foi observada uma mortalidade específica por câncer de 0,7% e uma taxa de sobrevida livre de recidiva de 95% em 10 anos, nos pacientes com TH, em comparação com uma mortalidade de 5% e uma taxa de sobrevida livre de recidiva de 85% em 10 anos em casos de CPT sem TH¹⁵.

Carcinoma Papilífero da Tireoide

Aspectos Gerais

Tumores da tiróide são endócrinopatias frequentes na população entre vinte e sessenta anos de idade. Cerca de 40% dos indivíduos apresentam nódulos tireoideanos, sendo em sua grande maioria nódulos foliculares benignos^{16,17}. Apenas cerca de 5% a 10% dos nódulos da tireoide são malignos sendo mais frequente o CPT¹⁸. A incidência de câncer de tireoide dobrou nos últimos 30 anos, especialmente nos países desenvolvidos, provavelmente devido ao aumento da detecção de nódulos ainda pequenos e de baixo risco¹⁹. Com o uso de melhores técnicas de diagnóstico, o CPT passou a ser identificado mais frequentemente do que no passado, e em fases iniciais da doença^{20,21} sendo hoje o tipo mais comum de neoplasia endócrina maligna humana e também responsável por mais de

70% de todos os cânceres da Tireoide¹⁸. A etiologia da CPT está relacionada provavelmente a fatores do meio ambiente, predisposição genética ou fatores hormonais como o estrógeno^{18,22}.

No Brasil perfil de incidência e mortalidade do câncer de tireoide é compatível com o descrito na literatura mundial. Foi observada durante a análise dos dados uma queda da mortalidade desses pacientes ao longo dos últimos 20 anos em ambos os sexos. Essa característica pode estar relacionada à melhora do diagnóstico e tratamento precoce do câncer tireoidiano em nosso país²³.

Foi observada também uma grande variação das taxas de incidência entre os locais estudados, especialmente para o sexo feminino. Belém, Porto Alegre, Recife e Salvador, apresentaram as menores taxas de incidência, enquanto São Paulo e Distrito Federal se destacam por apresentarem as maiores taxas. A hipótese levantada pelo autor refere que a disponibilidade e acesso a recursos diagnósticos entre essas regiões possa explicar, ainda que parcialmente, as variações regionais observadas, ao exemplo de que as mulheres utilizam mais serviços de saúde do que os homens, podendo isso interferir nos resultados. Além disso, é interessante notar que existem desigualdades na distribuição de médicos e leitos hospitalares entre as regiões brasileiras, com a maior disponibilidade de recursos sendo encontrada nas regiões sudeste, sul e centro-oeste, em detrimento ao norte e nordeste. Assim, a variabilidade das taxas de incidência entre esses locais deve estar relacionada a variações na cobertura dos sistemas de informação bem como na disponibilidade e acesso a recursos diagnósticos e terapêuticos²³.

Os tumores da tireoide representam mais de 90% de todos os carcinomas endócrinos, sendo o PTC a apresentação mais comum e de melhor prognóstico²⁴. São neoplasias caracterizadas por alterações genéticas entre as quais rearranjos de oncogenes RET e mutações em BRAF, RAS e P53. A alteração da proteína RET é uma das mais relevantes, pois pode ser encontrada no tecido da tireoide de pacientes com doença

inflamatória crônica, como a TH². Fatores ambientais, em especial a dieta com sal iodado, podem ter papel na patogênese desse tumor. Outros fatores, como a radioterapia externa na infância e adolescência, exposição à radiação ionizante, doença tireoidiana benigna preexistente e fatores genéticos, entre eles mutação de RAS, e rearranjos do RET/PTC (*rearranged in transformation/papillary thyroid carcinomas*) estão associados com o aumento do desenvolvimento do PTC²⁶. O uso difundido da radiação-X na década de 1950 para o tratamento de condições benignas como acne e hipertrofia do timo, contribuiu para a ampliação da incidência de CPT durante um período de tempo²². O aumento na incidência de CPT pode estar relacionado, em parte, a melhores métodos de detecção precoce da neoplasia, maior exposição ambiental a radiação eletromagnética e ao maior uso de radiação ionizante com fins terapêuticos¹⁹. Pessoas que foram expostas à radiação atômica, como observado no acidente nuclear em Chernobyl, na atual Rússia, desenvolveram não apenas carcinoma papilar com expressão de RET/PTC, mas também TH nos anos seguintes a exposição¹².

O CPT possui características morfológicas macroscópicas que podem variar de nódulos com menos de um centímetro a vários centímetros de diâmetro¹⁹, ser sólido ou cístico²⁸. Geralmente o tumor se apresenta como nódulo sólido, sendo em alguns casos composto pela combinação entre sólido e cístico e raramente são observados tumores que se apresentam completamente císticos. Tumores metastáticos podem ser císticos, enquanto a lesão primária é comumente sólida^{19,27}. Os nódulos sólidos normalmente ter uma coloração acinzentada e consistência firme, geralmente mostram uma superfície de corte branco acinzentada com bordas irregulares e ocasionais calcificações¹⁹. Os limites do nódulo podem ser infiltrativos ou circunscritos, com ou sem uma cápsula evidente. É possível se evidenciar áreas de esclerose e alterações degenerativas focais que podem ocorrer espontaneamente ou como resultado de PAAF anterior²⁸.

O CPT clássico exhibe arquitetura papilar complexa com frequentes corpos psamomatosos, as papilas são revestidas por células com citoplasma eosinofílico e os

núcleos são irregulares, sobrepostos e claros²⁸. O CPT variante folicular apresentam características histológicas distintas, características moleculares superficiais e comportamento biológico distinto. A maioria dos casos evolui favoravelmente, os pacientes têm uma sobrevida de cerca de dez anos até 98% dos casos, observa-se melhores resultados de sobrevida em pacientes com tumores encapsulados²⁹. O CPT é um carcinoma bem diferenciado e por sua vez, pode ser subclassificado de acordo com o aspecto histológico em diversas variantes⁷. Essas variantes apresentam características clínicas distintas correlacionadas com o tipo de mutação apresentada pelo tumor e seu nível de diferenciação celular.

A resposta imune eficiente pode eliminar as células cancerosas, porém, a ativação crônica de células inflamatórias em torno da neoplasia pode sustentar a proliferação de células neoplásica²⁷. Existe uma forte associação entre inflamação crônica e aumento da susceptibilidade à transformação neoplásica ao e desenvolvimento do câncer^{27, 29, 30}.

A coexistência de inflamação e câncer pode ser observada em vários tumores. A inflamação crônica está presente no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos³⁰. A persistente libertação de mediadores da resposta inflamatória no local do tumor pode afetar sua progressão como o aumento da taxa de proliferação de células tumorais, resistência a apoptose, promoção de angiogênese e por inibição de imunidade protetora antitumoral^{29, 30}.

O câncer de tireoide pode exibir componente inflamatório crônico associado que é frequentemente observado no CPT. Esta neoplasia frequentemente aparece em pacientes com doenças autoimunes, tais como a TH e a Doença de Graves (Liotti F). A presença do RET/PTC, RAS ou BRAF, que são os oncogenes mais comumente encontrados em CPT, podem estar relacionados ao desencadeamento da resposta inflamatória observada ao redor da neoplasia³⁰.

O CPT mais comumente se apresenta como um nódulo da tireoide que é descoberto por acaso ou em exame de rotina. Raramente, os pacientes se apresentam com metástases em linfonodos do pescoço ou com rouquidão causada pelo envolvimento do nervo laríngeo recorrente²⁸. Ocasionalmente o CPT apresentam-se com linfadenopatia cervical¹⁹ que é um sinal de mal prognóstico indicando doença avançada³⁰. Nódulos pequenos podem ser incidentalmente descobertos por estudos diagnósticos realizados para outras indicações¹⁹ através de exame de ressonância magnética e tomografia computadorizada apresentam melhor prognóstico, especialmente em pacientes jovens abaixo dos 40 anos, onde observa-se uma sobrevida de 20 anos em mais de 98% dos casos²². Os testes de função tireoidiana normalmente não são alterados pelo CPT.

Embora o CPT possa ocorrer em qualquer faixa etária, ele se apresenta mais frequentemente entre os 45 a 60 anos de idade e é mais comum em mulheres com uma prevalência de dez a vinte vezes maior a agressividade do CPT aumenta significativamente com a idade²⁶. Apesar de ser uma doença de mulheres adultas, é a principal causa de Bócio e Hipotireoidismo adquirido em crianças e adolescentes em áreas não endêmicas²⁵. O prognóstico para a maioria dos pacientes com CPT é excelente³⁰ no entanto, apesar do bom prognóstico o CPT pode dar origem a recorrências e metástases, por vezes, muitos anos após o diagnóstico³⁰. A recorrência regional ocorre em 20-30% dos pacientes entre dez a vinte anos após o diagnóstico inicial, e está associada com diminuição da sobrevida³¹. O atual sistema de estadiamento não identifica com segurança os pacientes em maior risco de recorrência e mortalidade³¹. A pesquisa de oncogenes envolvidos na formação do CPT e biomarcadores teciduais pode ser de utilidade na identificação das formas mais agressivas da neoplasia^{29, 30}.

Existem outras características clínicas e morfológicas do CPT, que têm sido frequentemente associados a prognóstico desfavorável, como idade avançada no momento do diagnóstico, sexo masculino, tamanho do tumor maior que 1 cm, extensão extra-

tireoidiana, multicentricidade tumoral, ausência de encapsulamento, invasão vascular e metástases à distância^{24,29,30}.

Aspectos Diagnósticos

Atualmente, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é o método mais utilizado para examinar nódulos tireoidianos solitários e convencionalmente é através desta técnica que se discrimina entre nódulos tireoidianos benignos e malignos^{22,28}. Ao contrário dos carcinomas de células foliculares e de células de Hürthle, o CPT tem características bem definidas ao exame citológico através da PAAF³², essas características específicas possibilitaram a sua subdivisão em 16 variantes na última classificação da OMS que possuem características citológicas e prognósticos distintos. Dentre essas variantes, os subtipos microcarcinoma, CPT clássico e a variante folicular do CPT são as variantes mais frequentemente diagnosticadas²⁹.

A Citologia através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é amplamente utilizada como ferramenta para o diagnóstico de lesões malignas da tireoide³². A citologia com PAAF é considerado a ferramenta mais valiosa para o diagnóstico pré-operatório de CPT resultando em diagnóstico de indeterminado ou suspeito em apenas dez a vinte por cento dos casos¹⁸ porem quando positivo o valor preditivo se mostra bastante elevado³². Nos casos considerados suspeitos ou positivos para CPT esta indicada cirurgia, porem em cerca de 20% destes casos os nódulos não são malignos. Isto leva a um número elevado de pacientes tratados desnecessariamente para a doença maligna, nesta situação a aplicação de imunohistoquímica com FOXP3, por exemplo, em material de PAAF, poderia ter utilidade na caracterização melhor das células suspeitas de malignidade permitindo reduzir as cirurgias desnecessarias^{26,33,34}.

Estudos mostram que a PAAF de Tireoide tem uma alta sensibilidade, variando de 92 a 98% e valor preditivo negativo da ordem de 97%, mas apresenta uma baixa especificidade devido a resultados como: suspeitos de malignidade, duvidoso ou indeterminado³⁴.

A investigação de um nódulo tireoidiano geralmente inclui ultrassonografia, exame nuclear, e biópsia por punção aspirativa com agulha fina (PAAF)^{28,32}. Padrões ultrassonográficos são convencionalmente aplicados para distinguir nódulos tireoidianos benignos de malignos. Existem padrões característicos do CPT. O primeiro é a presença de um nódulo sólido, hipoeecóico com focos ecogênicos, presença de microcalcificação, e o segundo padrão é o nódulo sólido, hipoeecóico com focos ecogênicos grosseiros³². Na varredura nuclear por cintilografia o CPT é geralmente um nódulo frio (baixa captação do radioisótopo), e raramente pode se apresentar como um nódulo quente (alta captação de radioisótopo). É importante notar que a captação do Tecnécio é mais comum do que a captação de Iodo, e apenas o último prediz uma lesão hiperfuncionante²⁸.

Nódulo palpável da glândula tireoide é um problema de ocorrência clínica comum. A maioria das lesões é de natureza benigna. O diagnóstico diferencial entre nódulos benignos e malignos baseia-se na avaliação citológica das células da Tireoide obtida por uma punção aspirativa, coradas por métodos de May-Grünwald Giemsa ou Papanicolaou³³. A PAAF de Tireoide tem uma alta sensibilidade, variando de 92 a 98% e valor preditivo negativo da ordem de 97%, mas apresenta uma baixa especificidade^{33,34}.

As variantes do CPT podem se correlacionar com o prognóstico do paciente³⁵. Algumas dessas variantes têm grande importância prognóstica sendo relevante demonstrar a diferenciação com o CPT clássico. A OMS reconhece variantes biologicamente mais agressivas que incluem os tipos sólido, esclerosante difuso, de células altas e de células colunares^{19,35}. Como exemplo de CPT agressivo, a variante sólida é caracteristicamente não encapsulada, com frequente invasão de margens e tecidos próximos, e compreende aproximadamente 3% dos casos²⁸, apresenta uma incidência significativamente maior de doença extra-tireoidiana, recorrência local e metástases, quando comparados com um grupo correspondente do variante usual de CPT em pacientes de semelhante idade, sexo e data de diagnóstico^{28,35}.

O diagnóstico de CPT através da PAAF baseia-se na morfologia nuclear como: núcleos aumentados e alongados, com sobreposição e aglomeração, contorno nuclear irregular; inclusões nucleares; sulcos intranucleares resultantes da irregularidade nuclear, nucléolos evidentes e inclusões nucleares²⁸.

O CPT apresenta diversas características arquiteturais e nucleares específicas que auxiliam no diagnóstico morfológico. Existem nódulos que têm aspectos nucleares de difícil caracterização através da PAAF e a ausência de núcleos claros com inclusões, sobreposição celular em agregados e dobras da cromatina torna a distinção entre benigno e maligno muitas vezes difícil. Exames complementares podem ajudar a esclarecer o comportamento da lesão. Vários marcadores imunohistoquímicos são de algum valor e sua aplicação na citologia para conclusão diagnóstica tem sido sugerida, mas existem limitações, econômicas e técnicas.^{28,35}

Existem marcadores de imunohistoquímica úteis na caracterização do CPT como: tiroglobulina, HBME-1, CK19, galectina-3, TTF-1, FOXP3.

A tiroglobulina ao exame imunohistoquímico está presente em todas as lesões da Tireoide. É apenas moderadamente expressa no CPT e exibe expressão variável no carcinoma anaplásico, porém é positiva em todas as lesões benignas. Por conseguinte, não é de utilidade como marcador de malignidade, mas sim como marcador de origem da Tireoide. Pode ser de valor, significativo, no diagnóstico diferencial de metástases para linfonodos cervicais^{34,37}.

HBME-1 é um anticorpo monoclonal, dirigido contra um epítipo desconhecido, que era inicialmente utilizada como marcador de células mesoteliais³⁴. Na Tireoide, HBME-1 é quase que exclusivamente expresso em neoplasias malignas, incluindo CPT, enquanto que as lesões benignas o resultado é negativo³⁶. HBME-1 é o marcador mais específico de malignidade da tireoide³⁸. A maioria dos autores lhe confere uma sensibilidade da ordem de

80%. No entanto, este anticorpo aparece também positivo em alguns adenomas e, em alguns nódulos benignos do bócio multinodular (Figura 4. A). Este anticorpo é, por conseguinte, considerado um marcador de malignidade se mais do que 25 a 30% são de células HBME-1 positivas³⁴.

CK19 é uma citoqueratina de elevado peso molecular que constitui um marcador sensível, mas não específica do CPT. A sensibilidade é maior em lesões da variante clássica e, portanto, não pode ser útil quando ela é mais necessária, na variante folicular e em lesões oncocíticas com atipia nuclear¹⁷. Este marcador é também fortemente expresso em tecido tireoidiano normal comprimido em torno de lesões, em Tireoidite linfocítica crônica, e em áreas reativas de tumores benignos, geralmente ao redor do local da biópsia anterior; portanto, a sua especificidade é muito pobre. No entanto, a presença de positividade para CK 19 generalizada em uma borda de lesão pode ser útil para apoiar o diagnóstico de CPT²⁸.

Galectina-3 é um membro da família de lactina que é expressa por células inflamatórias epiteliais. Esta é uma proteína de adesão celular também expressa pelas células de neoplasias malignas da tireoide e tem sido utilizada como marcador de malignidade na tireoide, no entanto, a sua expressão em alguns casos de bócio multinodular e Tireoidite limita a sua aplicação mais ampla. Sua sensibilidade varia de 87 a 100% e especificidade é elevada, da ordem de 94%. É considerada como uma imunomarcagem de valor na discriminação de lesões suspeitas de malignidade^{28, 34}.

TTF-1 (Fator Transcrição da Tireoide -1) é uma proteína reguladora da expressão de tiroglobulina, sendo uma molécula essencial na fisiologia da Tireoide. É útil com marcador de células da tireoide. Mais frequentemente expresso em lesões benignas, ele está presente nos tumores da Tireoide, principalmente se carcinomas forem dos tipos papilíferos, foliculares ou pouco diferenciados e podem ser positiva em alguns carcinomas medulares e em tumores oncocítico. Raramente utilizado nas citologias de lesões tireóideas^{34, 35}.

O Forkhead Box Protein 3 (FOXP3) foi recentemente observado no CPT com expressão fortemente positiva e também em doenças tireoidianas benignas com expressão mais fraca. Foi evidenciado que a positividade do FOXP3 pode exercer influencia em várias características de agressividade do CPT^{26, 39,40}. As alterações moleculares expressas pelo CPT têm sido extensivamente estudadas e desempenham um papel relevante na compreensão da patogênese e do comportamento da doença. Essas alterações podem proporcionar marcadores de diagnóstico e de prognóstico aplicáveis como auxílio para o diagnóstico das lesões suspeitas de malignidade e para o aumento da especificidade da citologia pré-operatória com PAAF⁴⁰.

O proto-oncogene RET codifica o receptor de membrana para um fator de crescimento das células nervosas. Esta é uma proteína do receptor de tirosina-quinase que é capaz de transformar uma célula normal em células da Tireoide superexpressas. A sua expressão é zero ou muito baixa em células da tireoide normal ou nódulos benignos. É expressa em células derivada da crista neural e no rim. No entanto, RET está envolvido em certo número de rearranjos conhecidos como RET / CPT que têm sido implicados no processo da carcinogênese do CPT. Entre os marcadores moleculares da CPT, os oncogenes com um papel patogênico no mecanismo de transformação celular da Tireoide são os mais promissores. Rearranjo do gene RET no CPT (RET/CPT) foi um dos primeiros oncogenes humanos descobertos e foi o oncogene primeiro proposto como um marcador para este tumor^{33, 34, 41,42}.

No entanto, o entusiasmo inicial foi posto em dúvida pelo achado de rearranjo do gene RET em lesões benignas, incluindo a TH e os adenomas. A constatação de que a expressão de RET/CPT não é absoluta como marcador do CPT levanta preocupações em relação a sua utilidade clínica nas PAAF inconclusivas ou suspeitas de malignidade^{41, 42}.

O BRAF é uma proteína quinase que tem um papel importante na proliferação celular, diferenciação, e morte celular programada. Mutações ativadoras de BRAF foram encontradas inicialmente em câncer de cólon humano e melanoma maligno⁴³. Estudos tem demonstrado que o BRAF também é mutado em CPT com alta frequência⁴⁴. A mutação mais frequente é o BRAF-V600e e ela provoca o aumento da atividade da quinase gerando maior proliferação celular⁴⁴. As mutações BRAF são mais frequentemente associada com a variante clássica e, como geralmente essa variante não levanta grades dúvidas diagnósticas, eles não necessitam dessa tecnologia auxiliar, mas pode ser útil para amostras de citologia de diagnósticos duvidosos. As mutações de BRAF são associadas a características clínicas mais agressivas, tais como extensão extracapsular, recidivas mais frequentes e metástases à distância⁴⁵. Além do mau prognóstico no CPT, a mutação de BRAF predispõe o tumor à perda de diferenciação, com possível transformação para carcinoma anaplásico e progressão da doença^{43, 44, 45}.

O p63 é um fator de transcrição nuclear³⁸ homólogo do gene p53⁴⁶. Esta sempre expresso nas células basais, escamosa e mioepiteliais, apresenta à imunoistoquímica uma positividade de 81,8% em focos de CPT⁴⁶. A expressão do p63 foi negativa no tecido tireoidiano normal, bócio nodular e adenomas foliculares. O achado de p63 em ninhos sólidos benignos na TH sugere uma possível relação com a TH e o CPT. A p63 se mostrou bastante específica para o diagnóstico de CPT⁴⁶.

FOXP3

O FOXP3 pertence à família de fatores de transcrição *forkhead Box* (FOX), caracterizada por um domínio *forkhead* (FKH), de ligação ao DNA⁴⁷. Localizados nos linfócitos T-reguladores (Treg), o FOXP3 tem seu papel no desenvolvimento e controle celular⁴⁸. As células T reguladoras têm como principal ação proteger as células do organismo de reação autoimune, inflamação e destruição tecidual, promovendo um bloqueio das células T, sendo o FOXP3 a chave principal para essa regulação^{40, 49}. O mecanismo no qual as células Treg agem na imunossupressão é através da inibição de contato célula-célula, e na produção de citocinas sendo a mais importante a interleucina-10 (IL-10), e o fator de transcrição beta (TGF-B)⁵⁰. A baixa expressão de FOXP3 em células Treg CD4 e CD25 tem predisposto a inúmeras doenças autoimunes⁴⁷. Na presença de alterações da expressão do FOXP3, trabalhos demonstram que este poderia ser um fator primordial para que as células tumorais escapassem da imunovigilância das células linfóides^{48, 51}.

As células tumorais poderiam desenvolver alterações nos receptores de citocinas e quimiocinas, alterando a expressão do FOXP3 e impedindo que se produza a IL-2 pelas células Treg, fator relevante na resposta imune antitumoral, dificultando a entrada das células imunovigilantes no tumor e a consequente apoptose^{52, 53}. Outro dado importante seria a ligação da inflamação crônica e o desenvolvimento de câncer e sua progressão. A inflamação favoreceria a expansão das células Treg no tecido sendo o primeiro passo para perpetuação das células cancerígenas⁵⁴. No sangue periférico de pacientes com câncer foi demonstrado uma alta densidade de células Treg⁵⁵.

O FOXP3 é expresso em várias neoplasias malignas como pulmão, mama, cólon, melanoma e leucemias. Admite-se que o FOXP3 poderia ser um fator de inicialização do câncer, assim como, de perpetuação da proliferação neoplásica⁵⁶. Existem dados que demonstram que o FOXP3 em câncer de cólon pode predizer um pior prognóstico, maior

invasividade local por provável modulação da capacidade do sistema imunitário em identificar as células de tumor⁵².

Na indução de células T regulatórias, citocinas provavelmente contribuem para o ambiente imunossupressor que promove a expressão de FOXP3³⁹. Têm sido observadas descrições onde o FOXP3 é visto tanto como fator importante para inicialização do câncer, como também teria um papel na evolução, sendo adotado como um indicador de mau prognóstico também no CPT⁵⁶. Exemplo disto é a presença do B7-H1 uma molécula que tem na sua função induzir anergia e apoptose dos linfócitos T, sendo um dos fatores para o aparecimento de câncer, junto com a supressão via FASL. Estes foram encontrados em 50% do paciente com câncer de mama sendo que na maioria houve um alto risco de malignidade quando associado com FOXP3⁵⁷.

A expressão de FOXP3 foi inicialmente considerada como restrita a células e tecidos hematopoiéticos; no entanto, foi relatada recentemente uma marcação com anti-FOXP3 no tecido mamário normal e carcinomatoso. Além disso, foi verificada uma expressão de FOXP3 em 60% dos adenocarcinomas pancreáticos e em todas as linhagens celulares de câncer de pâncreas analisadas⁵⁰. A expressão dessa proteína em tumores foi associada à menor probabilidade de sobrevida global e esse risco aumenta com a elevação da densidade da imunomarcação para FOXP3. A localização subcelular heterogênea de FOXP3 no carcinoma de mama traduz a presença de diferentes formas modificadas pós-translacionais de FOXP3. Novas investigações são necessárias para averiguar se essas modificações são funcionalmente relevantes⁵⁰.

Na mama e na próstata humana, a diferença notável entre as células epiteliais normais e cancerosas quanto à expressão de FOXP3 sugere fortemente uma relação entre o *down-regulation* de FOXP3 e o desenvolvimento de câncer⁵⁸. A expressão de FOXP3 serviu para discriminar o risco prognóstico de pacientes com câncer de mama e linfonodo negativo, uma vez que a sobrevida global de pacientes com linfonodos axilares negativos e

FOXP3 positivo foi significativamente inferior àquela de pacientes com linfonodos negativos e FOXP3 negativo⁵⁰.

A expressão de FOXP3 foi significativamente associada à positividade de linfonodos cervicais a maior índice de proliferação celular quando aplicado o exame de imunohistoquímica com MIB-1, enquanto nenhuma associação foi encontrada entre a expressão de FOXP3 nas células tumorais e parâmetros de prognóstico como tamanho do tumor, resposta histológica após quimioterapia neoadjuvante, número de mitoses, necrose e grau histológico⁵⁰.

Neste contexto o melhor entendimento do papel do FOXP3 no câncer pode permitir a sua utilização como biomarcador e mesmo como fator prognóstico, além de ser esta molécula um possível alvo no tratamento das neoplasias malignas. Não é conhecida a existência de associação entre a expressão do FOXP3 e a proliferação de células tumorais no CPT isolado ou em associação com TH⁵⁹.

Este fato levou ao questionamento de se a identificação através de exame imunohistoquímico da expressão de FOXP3 poderia sugerir um papel carcinogênico no desenvolvimento do CPT da Tireoide quando associado à TH⁶⁰.

VIII. MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo e Seleção de Biópsias

Foi realizado um estudo de série de casos coletados no período de 2000 a 2008 quando foram realizadas 1438 tiroidectomias totais no Serviço de Cirurgia do Hospital São Rafael, Salvador, Bahia. Destes casos, foram selecionados aqueles com diagnóstico de CPT, perfazendo um total de 466 casos, dos quais foram coletadas informações demográficas de prontuários eletrônicos do hospital. Foi realizada revisão das lâminas para classificação dos subtipos histológicos do CPT e identificação de TH. Os dados foram dispostos em banco de dados para análise estatística. Posteriormente foram randomicamente selecionados 30 casos de CPT para fins de exame imunoistoquímico com o anticorpo contra FOXP3, tendo em vista os custos elevados do exame. A randomização foi gerada através do *Random Allocation Software*.

CrITÉRIOS de Inclusão e Exclusão

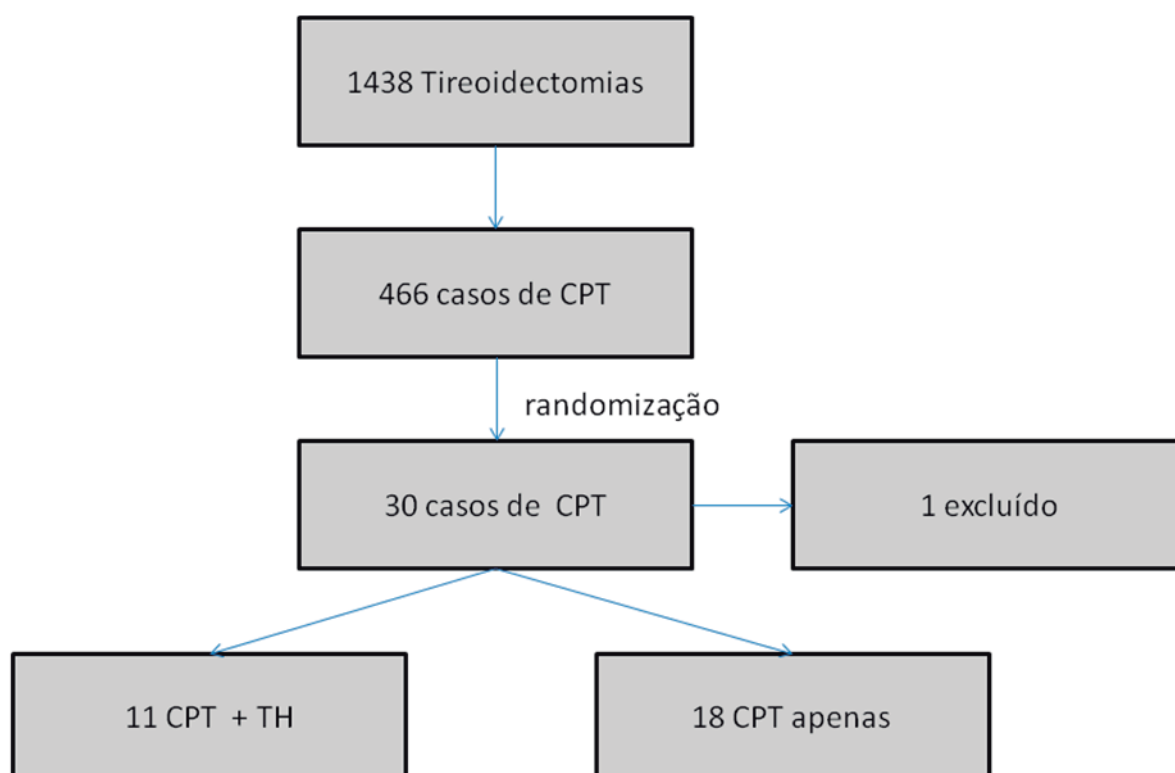
Foram incluídos todos os casos de CPT com e sem TH que apresentaram diagnóstico confirmado, por dois patologistas, de forma isolada. Os critérios de exclusão foram: casos com dados diagnósticos perdidos ou incompletos; casos de doença metastática para a tireoide.

Divisão de grupos do estudo

Foram considerados dois grupos:

1. CPT sem TH: Casos apenas com CPT.
2. CPT com TH: Casos com coexistência de CPT e TH.

Figura 2. Fluxograma das 1438 tireoidectomias com 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide.



A figura 1 descreve os casos de CPT selecionados entre as 1438 tireoidectomias com a randomização posterior para fins de imunohistoquímica.

Técnica de Imunoistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada com recorte dos blocos e confecção de lâminas com 5 µm, previamente silanizadas, recuperação antigênica com EDTA PH9 e marcação com anticorpo Anti-FOXP3 [mAbcam 22510] Abcam® clone 236A/E7 Cambridge, UK. A revelação foi feita com estreptovidina por trinta minutos em solução phosphate buffered

saline (PBS) com substrato mais cromógeno revelador diaminobenzidina (DAB) lavagem com água destilada e contra-corado com Hematoxilina de Harris.

As lâminas foram consideradas positivas para FOXP3 quando apresentavam coloração evidente nas células do CPT observados em quatro campos de 400x. Cada caso foi posteriormente classificado como positivo difuso se mais de 50% das células do CPT apresentou coloração ou positivo focal se menos de 50% das células estavam coradas. Foram consideradas negativas as lâminas em que não foi observada coloração para FOXP3 no CPT. Todas as lâminas foram vistas por dois patologistas isolados (Murilo Neves e Julia Miranda) e os casos discordantes foram revistos e classificados de comum acordo.

Análise Estatística

Para a inferência estatística, foi realizado o teste χ^2 (qui-quadrado), nas análises bivariadas, para comparar os dados das variáveis qualitativas do estudo (sexo, variante histológica, expressão de FOXP3 e tipo de expressão de FOXP3). Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças cujos valores de p foram inferiores a 0,05. A análise foi conduzida através do *software* estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, IBM) for Windows, versão 11.0.

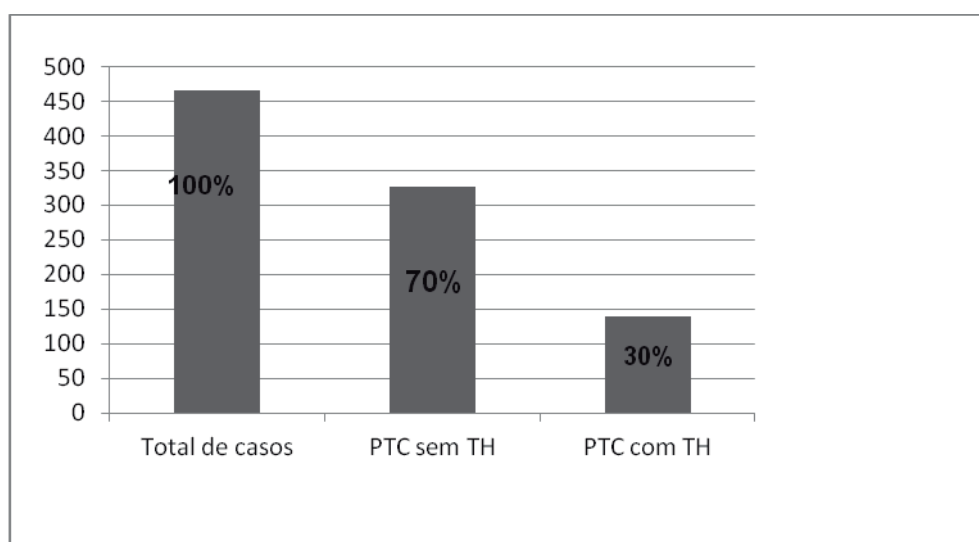
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael em 08 de Março de 2007 (Anexo 1).

IX. RESULTADOS

A frequência de TH em 466 casos de CPT é mostrada na Figura 2. Em 326 casos não havia coexistência TH (70% da amostra), enquanto 140 casos (30%) apresentavam a referida coexistência.

Figura 2. Frequência de Tireoidite Hashimoto em 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide.



Os aspectos demográficos e histológicos de 466 casos de CPT são mostrados na tabela 1. A média de idade da amostra foi de 41,3 anos (mínima de 18 e máxima de 77) e a maioria dos casos 392 pacientes (84,1%) era do sexo feminino (Tabela 1). Com relação às variantes histológicas, foi evidenciado que, do total da amostra (466 casos de CPT), 211 (45,3%) pacientes possuíam a variante do microcarcinoma papilífero, 186 (39,9%) apresentavam a variante clássica, 67 (14,4%) apresentavam a variante folicular e 2 (0,4%)

tinham a variante sólida. Não foram encontradas as variantes de células altas e de células claras.

Tabela 1. Aspectos demográficos e histológicos de 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide

Variáveis	Total de casos (n = 466)
Sexo feminino	267 (81,9%)
Idade em anos (média)	40,7
Variantes histológicas	
Microcarcinoma	211 (45,3%)
Clássica	186 (39,9%)
Folicular	67 (14,4%)
Sólida	2 (0,4%)

Quanto à divisão de grupos do estudo, dos casos apenas com CPT, 267 (81,9%) eram de mulheres e 59 (18,1%) eram de homens; nos casos com CPT e TH, foram encontrados 125 (89,3%) pacientes do sexo feminino e 15 (10,7%) do sexo masculino. Esta diferença encontrou significância estatística ($p=0,046$), como mostrado na Tabela 2. Nos casos apenas com CPT, a média de idade foi de 40,7 anos; nos casos com a CPT e TH, esse valor foi de 44,8 anos. Considerando as variantes histológicas de CPT, as diferenças entre os dois grupos do estudo (Tabela 2) não foram estatisticamente significantes ($p=0,47$). No entanto, observa-se maior frequência de casos da variante do microcarcinoma em pacientes com CPT e TH (50%), ao passo que as variantes clássica, folicular e sólida foram encontradas em maiores proporções no grupo CPT sem TH.

Tabela 2. Distribuição dos 466 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide com e sem Tireoidite de Hashimoto em relação a gênero, idade e variantes histológicas.

Variáveis	CPT sem TH (n = 326)	CPT com TH (n = 140)	Valor de p
Sexo feminino	267 (81,9%)	125 (89,3%)	0,046*
Idade em anos (média)	40,7	44,8	-
Variantes histológicas			0,47
Microcarcinoma	141 (43,3%)	70 (50%)	
Clássica	134 (41,1%)	52 (37,1%)	
Folicular	49 (15%)	18 (12,9%)	
Sólida	2 (0,6%)	0	

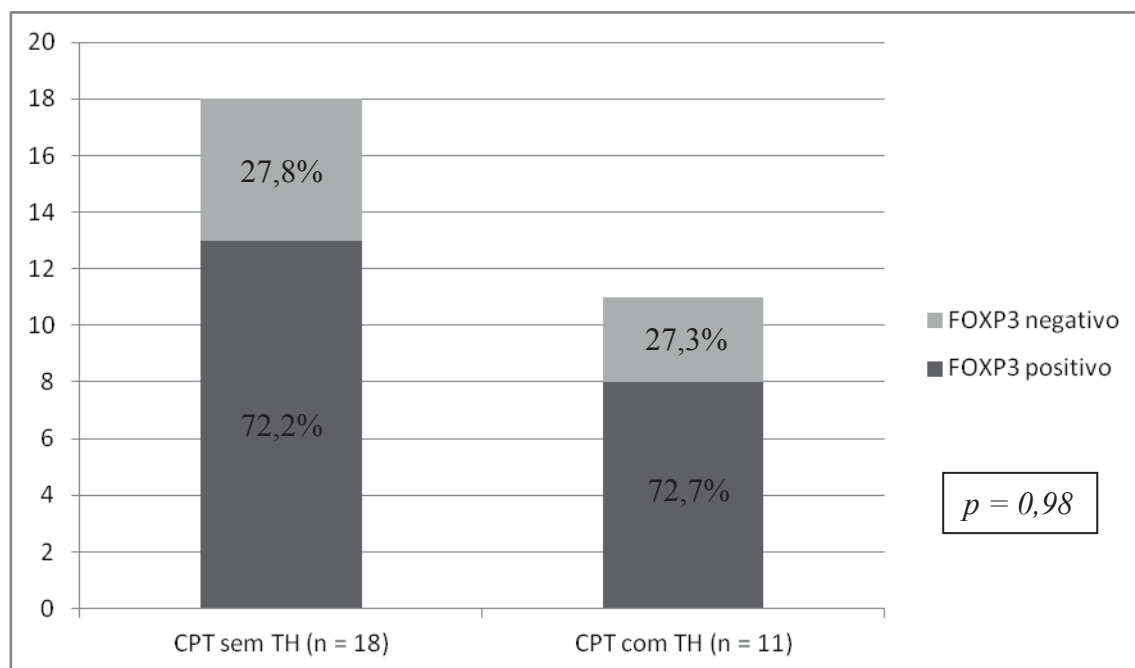
Foram selecionados 30 casos obtidos a partir da randomização dos 466 casos de CPT para realização de estudo imunohistoquímico visando determinar a expressão de FOXP3. Desta amostra um caso foi excluído por apresentar bloco de parafina com artefatos. As características demográficas, a frequência de TH e a expressão de FOXP3 na imunohistoquímica são evidenciadas na Tabela 3.

Tabela 3. Características demográficas, de frequência de Tireoidite de Hashimoto e de expressão de FOXP3 do subgrupo de 29 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide submetidos a exame imunoistoquímico.

Variáveis	n = 29
Sexo feminino	23 (79,3%)
Idade em anos (média)	42
Frequência de TH	11 (37,9%)
Expressão de FOXP3	21 (72,4%)

Dos 29 casos submetidos ao exame de imunoistoquímica observou-se que 23 (79.3%) casos eram do sexo feminino e seis (20.7%) eram do sexo masculino. A média de idade foi de 42 anos. 18 pacientes (62.1%) foram diagnosticados apenas com CPT e 11 (37.9%) tinham TH concomitante. A marcação positiva para FOXP3 na imunoistoquímica esteve presente em 21 (72.4%) de todos os casos analisados. A Frequência de Expressão de FOXP3 em 29 casos CPT com e sem TH é mostrada na Figura 3.

Figura 3. Frequência de expressão de FOXP3 em 29 casos Carcinoma Papilífero da Tireoide com e sem Tireoidite de Hashimoto.



Dos 29 casos acometidos por CPT isoladamente, treze (72,2%) apresentaram resultado positivo à reação com anticorpo anti-FOXP3, enquanto que oito casos (72,7%) com PTC mais TH foram positivos para FOXP3 (Figura 2). Esta diferença não foi estatisticamente significante ($p=0,976$). A distribuição do gênero e do tipo de expressão de FOXP3 na análise imunoistoquímica em 29 casos de CPT com e sem TH é mostrada na Tabela4.

Tabela 4. Análise do gênero, da frequência e do tipo de expressão de FOXP3 na análise Imunoistoquímica em 29 casos de Carcinoma Papilífero da Tireoide com e sem TH.

Variáveis	CPT sem TH (n = 18)	CPT com TH (n = 11)	Valor de p
Sexo feminino	13 (72,2%)	10 (90,1%)	0,228
Expressão de FOXP3	13 (72,2%)	8 (72,7%)	0,976
	(n = 13)	(n = 8)	
Tipo de expressão			0,195
Focal	6 (46,2%)	2 (25,0%)	
Difuso	7 (53,8%)	6 (75,0%)	

Dos 13 casos positivos diagnosticados apenas com CPT 6 (46,2%) apresentaram resultado positivo focal e 7 (53,8%) apresentaram resultado positivo difuso. Dos 8 pacientes positivos com diagnóstico conjunto de CPT e TH 2 (25,0%) obtiveram resultado positivo focal e 6 (75,0%) foram positivo difuso na reação para FOXP3; esta diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa. (Tabela 4).

A expressão de FOXP3 em diferentes tecidos tireoidianos normal, com TH e com CPT é mostrada na Figura 4.

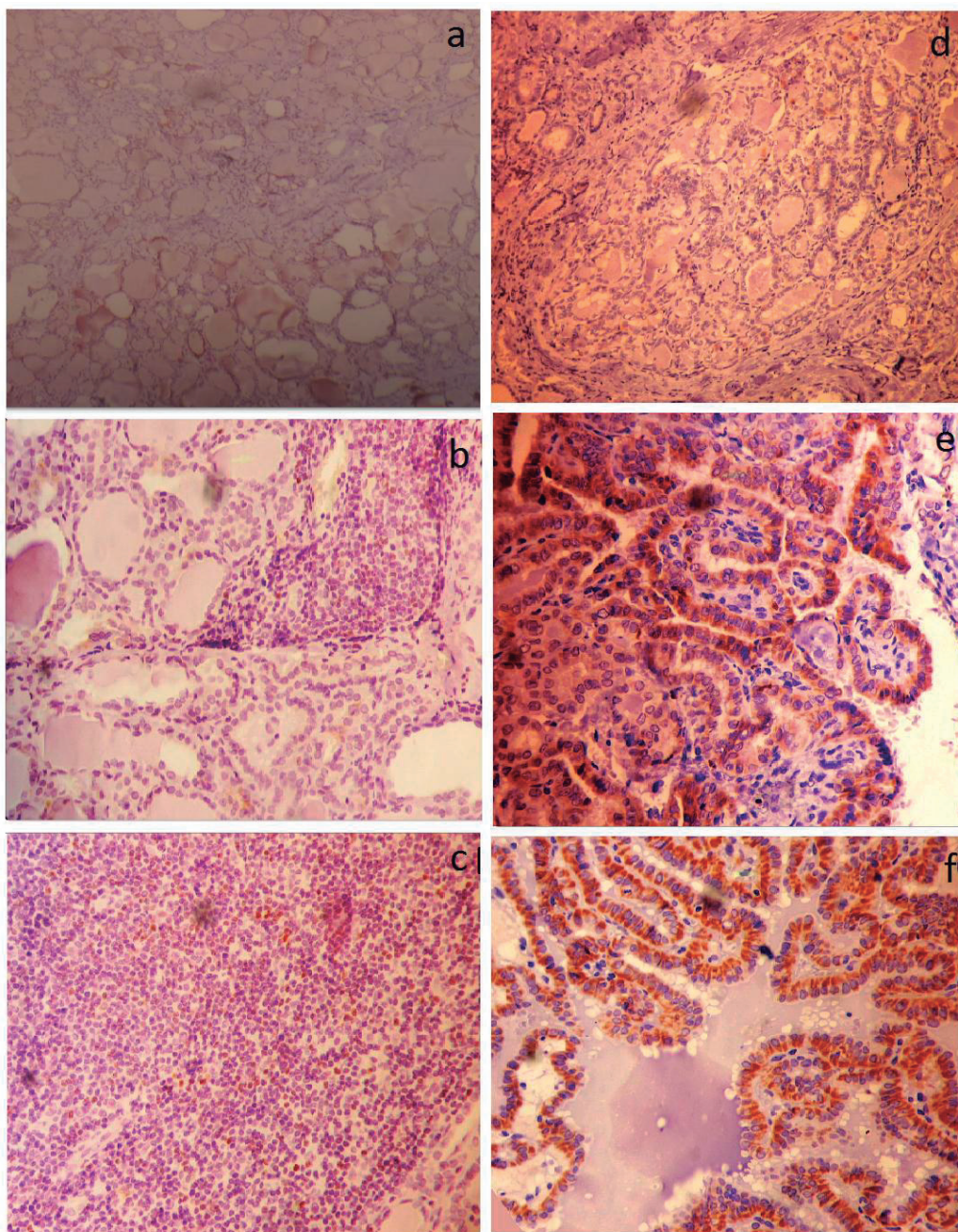


Figura 4. Imunoistoquímica com marcador de FOXP3: **a.** Sem marcação em tecido tireoidiano normal (aumento de 100x); **b.** Ausência de marcação por FOXP3 em tireoide apresentando infiltrado linfocitário de TH (aumento de 100x); **c.** Marcações pontuais de linfócitos FOXP3+ em infiltrado linfocitário TH, indicando presença de Linfócitos Treg (aumento de 200x); **d.** Ausência de marcação (FOXP3 negativo) no PTC (aumento de 100x); **e.** Marcação positiva focal no PTC, com menos de 50% de células do campo coradas (no aumento de 200x); **f.** Marcação positiva difusa no PTC, com mais de 50% das células do campo coradas (aumento de 200x).

Observa-se evidente coloração para FOXP3 no CPT e negatividade para tal marcação no tecido tireoidiano normal, com controle interno positivo para a reação evidenciado nas células Treg positivas do infiltrado linfoide da TH.

IX. DISCUSSÃO

A associação entre CPT e TH tem sido amplamente documentada tanto em estudos epidemiológicos como morfológicos^{5, 6,7}. No presente estudo foi documentado que a expressão difusa ou focal de FOXP3 foi intensamente observada nas células neoplásicas do PTC indicando que a avaliação da expressão desta molécula em casos suspeitos de neoplasia da tireoide contribui para o diagnóstico de PTC.

A associação entre CPT e TH, como relatado em diversos artigos, varia de 0,5 a 30%^{4, 5, 6, 7, 25, 26,62}. A população de pacientes com TH apresenta cerca de 2,8 vezes mais CPT do que pacientes sem TH⁶². É possível que o processo inflamatório crônico decorrente da doença e a predisposição genética para o desenvolvimento de lesões neoplásicas venha a desencadear o mecanismo de iniciação, promoção e progressão do câncer de tireoide. Esta possibilidade tem sido o objeto de investigações nos últimos anos, sendo possível que defeitos genéticos na cascata de sinalização, por meio de ativação e inativação dos oncogenes e de mutações de série participem no desenvolvimento de carcinoma. Atualmente, a forma mais conhecida de alteração genética no CPT é o RET/PTC⁶². A relação entre o CPT e a TH sugere uma associação não apenas accidental. A presença de processo inflamatório crônico poderia induzir a ativação de genes que desencadeariam a transformação maligna⁷. O rearranjo cromossômico RET/PTC que está presente no CPT é também encontrado na TH em 68% dos casos¹⁰. Todavia ainda não foi esclarecido se há relação ou não deste rearranjo cromossômico com o processo inflamatório crônico da TH. Os pacientes expostos à radiação do desastre nuclear de Chernobyl desenvolveram não só CPT com expressão de RET/PTC, mas também TH associada.

O papel da inflamação na carcinogênese é atualmente aceito desde o surgimento de evidências de que o microambiente inflamatório é um componente essencial de todos os tumores, inclusive nos que uma relação causal direta com a inflamação, ainda não foi ainda

comprovado^{47, 63}. Existem dois mecanismos distintos para explicar a correlação entre a TH e o RET/PTC. O primeiro sugere que a inflamação pode facilitar o rearranjo RET/PTC. De acordo com esta hipótese, a produção de radicais livres, a secreção de citocinas, a proliferação celular e fatores relacionados com a inflamação podem predispor a mutações nas células foliculares. Sabe-se também que a taxa de mutação é muito maior em tecidos com inflamação crônica do que em tecidos normais⁶³. O segundo sugere que rearranjos do RET/PTC possam promover o recrutamento de células inflamatórias. A liberação persistente de moléculas inflamatórias pela neoplasia pode levar a progressão tumoral através do aumento da proliferação de células tumorais, da resistência a apoptose, da promoção da angiogênese e da remodelação do estroma, além de inibir o estabelecimento de imunidade antitumoral protetora. O câncer da tireoide exibe um componente inflamatório, que inclui diferentes tipos de leucócitos, e é frequentemente observado em tumores da tireoide particularmente no CPT. A inflamação crônica está ligada ao estresse oxidativo que pode causar danos no DNA e contribuir para iniciar alterações genéticas, com expressão de oncogenes, e desenvolvimento de câncer ou apoptose⁶³.

Os casos de CPT tiveram média de idade compatível com o que tem sido descrito na literatura bem como a frequência maior observada no sexo feminino. Também não observamos diferenças com relação à idade e sexo nos casos de CPT isolado ou associado à TH. Estes dados também estão de acordo com os observados na população adulta com CPT⁸ tendo em vista que os casos estudados neste trabalho ocorreram entre dezoito e setenta sete anos de idade. Com relação às variantes histológicas, foi evidenciado que, do total da amostra de 466 casos de CPT, a maioria apresentava a variante do microcarcinoma papilífero, posteriormente a variante clássica, depois a variante folicular e menos de 1% dos casos tinham a variante sólida. Não foram encontradas nem a variante de células altas nem a variante de células claras. Em dois trabalhos anteriormente realizados foi identificado um maior número de casos da variante folicular^{5, 7} do CPT associado à TH. As razões para esta diferença de associação entre subtipos histológicos e TH ainda carece de esclarecimento, é possível que a população submetida à tiroidectomias tenha realizado o

procedimento cirúrgico, ainda na fase inicial da doença o que motivou a observação de maior número de caso de microcarcinoma, somasse a isso o fato de a maioria dos caso ter sido operado após PAAF com resultado suspeito ou diagnóstico de carcinoma papilífero. No nosso estudo a distribuição das variantes histológicas do PTC com e sem TH não apresentou diferença sugerindo que a TH não esta relacionada com uma variante histológica específica do CPT.

A expressão de FOXP3 no CPT foi evidenciada no presente estudo através de Imunoistoquímica realizada com anticorpos específicos para FOXP3. Obtivemos resultado altamente positivo tanto a expressão difusa como focal em 72,4% de casos de CPT. Recentemente foi observada expressão de FOXP3 em 91,9% dos casos de PTC (26). Ênfase nos últimos anos tem sido dada ao FOXP3 devido este ser um marcador de células T regulatórias.

As doenças autoimunes como a TH estão associadas à falha nos mecanismos de regulação da resposta imune. Neste caso é possível que durante o processo inflamatório crônico, os linfócitos Treg possam atuar no sitio inflamatório através do seu conhecido mecanismo modulador na tentativa de atenuar a lesão tecidual. Como consequência da tentativa de modulação da resposta imune poderá haver uma diminuição da defesa imune contra as células neoplásicas e o desenvolvimento de câncer. Todavia os nossos dados mostram uma fraca expressão de FOXP3 em pequenas áreas da TH. Em contraste forte expressão desta molécula só foi documentada apenas no CPT. Esta observação contrasta com os dados recentemente publicados por Cunha et al. 2012 onde a expressão do FOXP3 aconteceu em tecidos normais.

A relação de FOXP3 com câncer têm sido documentados em cultura de células do carcinoma da mama⁴⁹, próstata⁶⁰ pâncreas e melanoma⁵¹. A expressão do FOXP3 em cultura de células epiteliais pancreáticas malignas foi confirmada com coloração principalmente citoplasmática e por vezes nuclear, as células normais de ductos

pancreáticos não expressaram FOXP3. Ocorre também positividade em linfócitos que infiltram o tecido tumoral⁴⁰ e as células normais da próstata expressam FOXP3 nuclear⁶⁰. No caso da CPT o FOXP3 foi fortemente expresso nas células cancerosas, e com intensidade fraca em linfócitos.

Os mecanismos responsáveis pela expressão de FOXP3 em células tumorais permanecem pouco esclarecidos. No câncer de mama, o FOXP3 funciona como supressor da proteína oncogênica SKP2. A transfecção de FOXP3 resultou em aumento de p27 que é o alvo principal do SKP2⁵⁹. O aumento da expressão de FOXP3 foi documentado apenas em células expressando P53. O FOXP3 foi descrito no câncer da próstata relacionado a mecanismos moleculares de repressão do gene MYC e inativação somática do FOXP3⁶². No câncer de pâncreas, as células neoplásicas expressaram FOXP3 citoplasmático e nuclear, sugerindo que a presença em células cancerígenas pode disparar um mecanismo de evasão imune. As células do melanoma maligno também apresentam positividade para FOXP3⁴⁷.

Nossos resultados demonstraram que não houve diferenças significativas na expressão do FOXP3 no CPT seguidos ou não de TH, evidenciando que a expressão do FOXP3 no CPT independe da coexistência da TH. Este fato sugere que a TH não parece provocar a expressão do FOXP3 e que o mecanismo relacionado ao processo de transformação maligna deve ser responsável pela expressão anômala observada do FOXP3 na membrana citoplasmática das células do CPT.

Na TH podem existir pequenos nódulos sólidos, que apresentam moderadas atipias denominadas de ninhos sólidos de células (NSC), que podem mimetizar o CPT. Os NSC podem ser do tipo 1 e 2. Enquanto os do tipo 2 são facilmente distinguidos do CPT, a diferenciação dos NSC do tipo 1 é mais difícil tendo em vista que as células dos NSC apresentam núcleos ovoides com cromatina clara, dobras da cromatina e são frequentemente cercados por membrana basal espessada. O exame de imunistoquímica com P63 e HBME1 pode ser útil na diferenciação entre CPT e NSC. Enquanto os NSC são

fortemente positivos para o P63, somente o tipo 1 é positivo para coloração pelo HBME1⁶¹. No presente trabalho foi observado que a expressão significativa do FOXP3 em biópsias da tireoide, observada através da imunistoquímica, pode ter um papel de marcador de CPT aplicável em casos de difícil caracterização diagnóstica. A utilização do FOXP3 como marcador teria grande importância em casos com NSC, nos quais a aplicação de imunistoquímica conjunta com p63, HBME1 e FOXP3, poderia alcançar uma maior especificidade na diferenciação entre os NSC presentes na TH e o CPT.

A utilização do FOXP3 pode também tornar-se útil como marcador em exame citopatológico nos casos considerados suspeitos de malignidade onde a positividade poderia auxiliar a definir como verdadeiramente maligna e também em casos de TH com NSC em material cirúrgico, nos quais, com a união da reação de imunistoquímica para p63, HBME1 e FOXP3, se alcançaria uma maior especificidade na diferenciação entre os NSC da tireoidite e o CPT. Desta forma, pode-se evitar que procedimentos radicais como a tireoidectomia sejam realizados desnecessariamente em tireoide de pacientes nas quais discretas atipias nucleares inconclusivas possam ser confundidas com o CPT da Tireoide.

Estes resultados apontam para a possibilidade do uso do FOXP3 como auxílio no diagnóstico de CPT através de PAAF visando aumentar a positividade ao exame citológico que permita indicação de cirurgia radical curativa em fases precoces da doença. O FOXP3 está significativamente presente no CPT, podendo também ser utilizado como um identificador confiável, em biópsias, nas áreas suspeitas de malignidade. Soma-se a isto o fato de que o FOXP3 está presente de forma pouco intensa ou mesmo ausente no tecido tireoidiano normal²⁶. Corroborando a ausência de expressão de FOXP3 em tecido normal, a positividade para FOXP3 no presente trabalho, não foi documentado em áreas com tecido tireoidiano sadio e sendo somente fracamente observada em linfócitos nas áreas de TH e ao redor do PTC.

O FOXP3 é sabidamente um marcador de células T regulatórias, mas recentemente ênfase tem sido dada a expressão desta molécula em tumores malignos de vários sítios²⁸.

No presente estudo foi avaliada a expressão desta molécula em tecido tireoidiano de pacientes com CPT apresentando ou não TH. Nossos dados indicam que o FOXP3 é altamente expresso no CPT e que não há diferença de expressão de FOXP3 no CPT com ou sem TH. Do ponto de vista prático o exame imunohistoquímico com FOXP3 pode ser útil na distinção entre PTC e NSC e pode contribuir para o diagnóstico da CPT.

XI. PROPOSTAS DE ESTUDO

Novo estudo com de maior número de caso de CPT com e sem TH e posterior pesquisa de expressão do FOXP3 visando quantificar uma possível diferença entre os dois grupos. A criação de Coorte de pacientes com TH visando observar a frequência de casos de CPT, bem como a realização de metanálise que já se encontra em fase de elaboração com o objetivo de buscar na literatura médica dados sobre a associação da Tireoidite com o câncer da tireoide.

XII. CONCLUSÕES

1. O FOXP3 apresenta alta positividade ao exame de imunoistoquímica no PTC
2. Não houve diferença de expressão do FOXP3 no CPT nos casos com e sem TH
3. Não se observou diferenças entre os subtipos de CPT com relação a presença ou não da TH.

XIII. SUMMARY

Title: Papillary thyroid carcinoma associated whit Hashimoto's thyroiditis

Background: Thyroid tumors are common endocrine disorders in the population between 20 and 60 years where about 40% have thyroid nodules, and only 5% to 8% of these are malignant, mostly composed of papillary carcinomas (CPT), today the most common type of malignant endocrine neoplasm and accounts for over 70% of all thyroid cancers. The FOXP3 is a member of the family of regulators of transcription, which is involved in regulating the development and function of immune system. It is expressed in normal cells and non-lymphoid cancer. The FOXP3 is expressed in many epithelial tumor tissues not only as lung, breast, colon, but also in the original tissues, such as melanoma and leukemia. Thus, this study aims to identify the presence of this protein in papillary thyroid carcinoma.

Objective: Describe the expression of FOXP3 in PTC associated or not whit Hashimoto's thyroiditis.

Methods: Between 2000 to 2008, 1438 total thyroidectomy was performed in the Department of Surgery, Hospital São Rafael, Salvador, Bahia, Brazil, 466 cases with CPT, of which were collected demographic information from electronic medical records of the hospital to histological subtypes of PTC and identification of TH. The data were arranged in a database for statistical analysis. Subsequently, 30 patients were randomly selected for purposes of PTC immunohistochemistry with antibodies against FOXP3.

Conclusion: The FOXP3 showed high positivity in PTC There is no difference in coexistence of TH or not. It is necessary to emphasize the importance of continued study for reproduction and confirmation of data from the positivity of FOXP3 as PTC identifier.

Keywords: thyroiditis, carcinoma, FOXP3, Immunohistochemistry, Pathology, Carcinogenesis.

XIV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zaletel K e Gaber S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease Current Genomics, 12, 576-88, 2011.
2. Gayathri BN, Kalyani R, Harendra KML. Fine needle aspiration cytology of Hashimoto's thyroiditis. Journal of Cytology. 28(4): 210–13, 2011.
3. Ozen S, Berk O, Şimşek DG e Darcan Ş. Clinical Course of Hashimoto's Thyroiditis and Effects of Levothyroxine Therapy on the Clinical Course of the Disease in Children and Adolescents. Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology; 3(4):192-197, 2011.
4. Benvenga S. Update on thyroid cancer. Horm Metab Res, v. 40, n. 5, p. 323-8, 2008.
5. Strauss M, Laurian N, Antebi E. Coexistent carcinoma of the thyroid gland and Hashimotos thyroiditis. Surgery Gynecology & Obstetrics, v. 157, n. 3, p. 228-32, 1983
6. Ahn D, Heo JS, Park HJ, Kim HJ, Sohn HJ, Park YJ et al. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. *Acta Oncologica*; 50: 1228–1234. 2011.
7. Cipolla C, Sandonato L, Graceffa G, Fricano S, Torcivia A, Vieni S, et al. Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid carcinoma. *Am Surg*; 71:874 – 8. 2005.
8. Cotran RS, Kumar V, Abbas F. O sistema endócrino, In: Robbins, SL, Contran, R.S, Kumar V, Abbas F. Patologia: bases patológicas das doenças. 8^A. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1011-47. 2010.
9. Rosai J. Surgical pathology. Philadelphia: C V Mosby; Thyroiditis; p.519-24. 2004.
10. Rhoden KJ et al. RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimotos thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2414-23, 2006.

11. Nikiforov YE. RET/CPT Prevalence of RET/CPT rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2040-2, 2006.
12. Unger K et al. Heterogeneity in the distribution of RET/CPT rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, n. 9, p. 4272-9, 2004.
13. Kim EY, Kim WG, Kim WB, Kim TY, Kim JM, Ryu JS, et al. Coexistence of chronic lymphocytic thyroiditis is associated with lower recurrence rates in patients with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*;71: 581 – 6. 2009.
14. Shim YS, Lee YS, Lee GH, Lee BC, Jung YW, Lee JW, et al. Clinical assessment and management of papillary thyroid carcinoma with coexistent Hashimoto's thyroiditis. *Korean J Otolaryngol – Head Neck Surg*; 50:537 – 1; 2007.
15. Kashima K, Yokoyama S, Noguchi S, Murakami N, Yamashita H, Watanabe S, et al. Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*; 8:197 – 202. 1998.
16. Loh KC, Greenspan FS, Dong F, Miller TR, Yeo PP. Influence of lymphocytic thyroiditis on the prognostic outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*; 84:458 – 63. 1999.
17. Saleh HA, Jin B, Barnwell J, Alzohaili O. Utility of immunohistochemical markers in differentiating benign from malignant follicular-derived thyroid nodules. *Diagnostic Pathology* 26; 5:9, 2010.
18. Vierlinger K, Mansfeld MH, Koperek O, Nöhammer C, Kaserer K, Leisch F. Identification of SERPINA1 as single marker for papillary thyroid carcinoma through microarray meta-analysis and quantification of its discriminatory power in independent validation. *BMC Medical Genomics* 6;4:30, 2011.
19. Khanafshar E, Lloyd RV. The Spectrum of Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Advances in anatomic pathology*, 18:1, 2011.

20. Vriens MR, Moses W, Weng J, Peng M, Griffin A, Bleyer A, Pollock BH, Indelicato DJ, Hwang J, Kebebew E. Clinical and Molecular Features of Papillary Thyroid Cancer in Adolescents and Young Adults. *Cancer* 15;117(2):259-67, 2011.
21. Eze OP, Starker LF, Carling T. The Role of Epigenetic Alterations in Papillary Thyroid Carcinogenesis. *Research Journal of Thyroid Research*, 895470, 2011.
22. Loyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head & Neck Pathology* , 5(1):51-6, 2011.
23. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro APAV e Vaisman M. Incidência e Mortalidade por Câncer de Tireoide no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, vol 49 nº 4 Agosto, 2005.
24. Chrisoulidou A, Boudina M, Tzemailas A, Doumala E, Iliadou PK, Patakiouta F, Pazaitou-Panayiotou K. Histological subtype is the most important determinant of survival in metastatic papillary thyroid cancer. *Thyroid Res.* Jul 19; 4 (1) :12. 2011.
25. Neves Junior MP; Camandaroba MPG; Almeida MAC; Miranda JS. Thyroid papillary carcinoma and histologic variants linked to Hashimoto disease. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45 , n. 5, p. 389-393, outubro 2009.
26. Cunha L L, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassalo J. FOXP3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)*.2012;67(5):483-8
27. Liotti F, Visciano C, Melillo RM. Inflammation in thyroid oncogenesis. *Am J Cancer Res*; 2(3):286-297. 2012.
28. Al-Brahim N, Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med.* Jul; 130 (7) :1057-62. 2006.
29. Eloy C, Santos J, Soares P, Sobrinho-Simões M. The preeminence of growth pattern and invasiveness and the limited influence of BRAF and RAS mutations in the occurrence of papillary thyroid carcinoma lymph node metastases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 28, 2011.

30. Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Schreiber RD, Smyth MJ. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *PNAS*; 105: 652-656. 2008.
31. O'Neill CJ, Bullock M, Chou A, Sidhu SB, Delbridge LW, Robinson BG, Gill AJ, Learoyd DL, Clifton-Bligh R, Sywak MS. BRAFV600E mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer. *Surgery*, 148(6):1139-45, 2011.
32. Das DK, Sheikh M, Mallik MK, Sharma PN, Mannan AA, Sheikh ZA, Haji BI, George SS, Madda JP, Hussein S, Francis IM. Papillary thyroid carcinoma: How much should the surgeon read from Fine needle aspiration cytology reports? *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53(4):686-91, 2010.
33. Marotta V, Guerra A, Sapio MR, Vitale M. RET/CPT rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint. *Eur J Endocrinol*. Oct; 165 (4) :499-507. 2011.
34. Vielh P, Mansuet-Lupo A, Polivka M, Saada M, Cochand-Priollet B. [Update on thyroid immunocytochemistry and its value for managing patients with thyroid nodules]. *Ann Pathol*. Oct; 26 (5) :340-5. 2006.
35. Lin JD, Hsueh C, Huang BY. Papillary thyroid carcinoma with different histological patterns. *Chang Gung Med J*. Jan-Feb; 34 (1) :23-34, 2011.
36. Saleh HA, Jin B, Barnwell J, Alzohaili O. Utility of immunohistochemical markers in differentiating benign from malignant follicular-derived thyroid nodules. *Diagnostic Pathology* 26; 5-9, 2010.
37. Singh B, Shaha AR, Trivedi H, Carew JF, Poluri A, Shah JP. Coexistent Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: Impact on presentation, management, and outcome. *Surgery*; 126:1070 – 6; discussion 1076 – 7. 1999.
38. El Demellawy D, Nasr A, Alowami S. Application of CD56, P63 and CK19 immunohistochemistry in the diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. *Diagn Pathol*. Feb 6; 3:5. 2008.

39. French JD, Weber ZJ. et.al Tumor-Associated Lymphocytes and Increased FOXP3⁺ Regulatory T Cell Frequency Correlate with More Aggressive Papillary Thyroid Cancer. *Cancer*. 95 (5): 2325, 2010.
40. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, Grützmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger HD, Klöppel G, Kabelitz D, Kalthoff H. FOXP3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*. Sep 1; 67 (17) :8344-50. 2007.
41. Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Moretti MI, Deandrea M, Motta M, Limone PP, Fenzi G, Rossi G, Vitale M. Prevalence of RET/CPT rearrangement in benign and malignant thyroid nodules and its clinical application. *Endocr J.*; 58 (1) :31-8. 2011.
42. Goncalves AP, Videira A, Maximo V, Soares P. Synergistic growth inhibition of cancer cells harboring the RET/CPT1 oncogene by staurosporine and rotenone involves enhanced cell death. *J Biosci*. Sep; 36 (4) :639-48. 2011.
43. Nucera C, Lawler J, Hodin R, Parangi S. The BRAFV600E mutation: what is it really orchestrating in thyroid cancer?. *Oncotarget*. Dec; 1 (8) :751-6. 2010.
44. Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *J Chin Med Assoc*. Mar; 73 (3) :113-28. 2010.
45. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*; 28:742-62. 2007.
46. Vrabie CD, Terzea D, Petrescu A, Waller M. The histopathology analysis of the diffuse sclerosing variant of the papillary carcinoma of the thyroid: a distinctive and rare form. *Rom J Morphol Embryol*. 50 (4) :743-8. 2009.
47. Martin F, Ladoire S, Mignot G et al. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*. v. 22: p. 4121-9, 2010.
48. Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Elkum N, Al-Tweigeri T, Dermime S. FOXP3⁺ Tregs and B7-H1⁺/PD-1⁺ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy, *BMC Cancer*. Feb 23;8:57, 2008.

49. Zhou X, Bucktrout SB, Jeker LT, Jeffrey A. Plasticity of CD4⁺ FOXP3⁺ T cells. *Curr Opin Immunol*. June; 21(3): 281–285, 2009.
50. Merlo A et.al. FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 27, n.11, p.1746-1752, 2009.
51. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, Barda AK, et.al. FOXP3 expression in human cancer cells. *Journal of Translational Medicine*, 6:19, 2008.
52. Schreiber TH. The Use of FOXP3 as a Biomarker and Prognostic Factor for Malignant Human Tumor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16:1931-1934, 2007.
53. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) FOXP3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. Mar 15; 107 (6) :2409-14. 2006.
54. Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, Thompson TC, Old LJ, Wang RF. CD8⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. Dec 1; 13 (23) :6947-58. 2007.
55. Michel S, Benner A, Tariverdian M, Wentzensen N, Hoefler P, Pommerencke T, Grabe N, von Knebel Doeberitz M, Kloor M. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*. Dec 2; 99 (11) 2008.
56. Ladoire S, Arnould L, Mignot G et al. Presence of FOXP3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 125:65-72, 2010.
57. Kilinc MO, Rowswell-Turner RB, Gu T, Virtuoso LP, Egilmez NK. Activated CD8⁺ T-effector/memory cells eliminate CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T-suppressor cells from tumors via FasL mediated apoptosis. *J Immunol*. Dec 15; 183 (12) :7656-60, 2009.
58. Martin F, Ladoire S. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating FOXP3⁺ regulatory T cells. *Clinical Cancer Research* Apr 15;14(8):2413-20, 2008.

59. Zuo T, Liu R, Zhang H et al. *FOXP3* is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene *SKP2*. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 117, p 3765-73, 2007.
60. Wang L, Liu R, Li W et al. Somatic Single-hits Inactivate the X-linked Tumor Suppressor *FOXP3* in the Prostate. *Cancer Cell*. 16(4): 336–346, 2009.
61. Seethala RR, Chiosea SI. Solid Cell Nests, Papillary Thyroid Microcarcinoma, and HBME1. *American Society for Clinical Pathology*, 134:167-170; 2010.
62. Konturek A, Barczyński M, Wierzchowski W, Stopa M, Nowak W. Coexistence of papillary thyroid cancer with Hashimoto thyroiditis. *Langenbecks Arch Surg*. 1021-23, 2012
63. Liotti F, Visciano C, Melillo R M. Inflammation in thyroid oncogenesis *Am J Cancer Res*. 2(3): 286–297. 2012.

VI ANEXOS


Anexo 1 Autorização do Comitê de Ética do Hospital São Rafael.

Anexo 2 **Carcinoma Papilífero da Tireoide Associado à Tireoidite de Hashimoto: uma Série de Casos.** Camandaroba M P G, Mata L S, Almeida L B, Miranda J S, Neves MP. Revista Brasileira de Cancerologia 2009; 55(3): 255-261

Anexo 3 **Carcinoma papilífero da tireoide e suas variantes histológicas associados à tireoidite de Hashimoto.** Neves MP; Camandaroba M P G, Almeida M A C, Miranda J S. J Bras Patol Med Lab.. 45 (5) 389-93, 2009.

Anexo 4 **FOXP3 Expression in Papillary Thyroid Cancer.** Neves MP, CorreiaT C, Mascarenhas M B, Camandaroba M P G, Carvalho E M . 2012

ANEXO 1

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

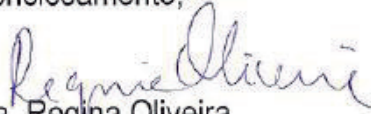
Prezado pesquisador:

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

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

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

Atenciosamente,


Dra. Regina Oliveira
Coordenadora do CEP / HSR

Dra. Regina Oliveira
Coordenadora do CEP
Monte Tabor/ HSR

Carcinoma Papilífero da Tireoide Associado à Tireoidite de Hashimoto: uma Série de Casos

Hashimoto Disease Linked to Thyroid Papillary Carcinoma: a Number of Cases
Carcinoma Papilar Tiroideo Asociado con la Tiroiditis de Hashimoto: una Serie de Casos

Marcos Pedro Guedes Camandaroba¹, Lucas Sampaio Mata², Leonardo Brito de Almeida², Júlia Souto Miranda³, Murilo Pedreira Neves⁴

Resumo

Estudo que teve como objetivo quantificar a coexistência da tireoidite de Hashimoto no carcinoma papilífero da tireoide, correlacionando-a com os dados demográficos, informações clínicas e diagnósticos anatomopatológicos prévios. Realizou-se um estudo de série de 347 casos de pacientes com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma papilífero da tireoide no serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Rafael, de janeiro de 2000 a dezembro de 2007. Foram feitas aplicações de formulários aos casos, visando a coletar os dados demográficos e as informações clínicas; os exames anatomopatológicos foram diagnosticados pelos dois patologistas deste estudo. O estudo apresentou uma coexistência de 31,4% de tireoidite de Hashimoto em pacientes com carcinoma papilífero da tireoide. No sexo feminino houve um total de 96 casos (88,1%), o que demonstra maior frequência quando comparado com os casos sem a coexistência. A série de casos apresentada mostrou uma frequência de 31,4% de tireoidite de Hashimoto nos casos de carcinoma papilífero da tireoide, sugerindo uma associação não apenas casual, mas que levanta a possibilidade de uma relação de causa e efeito entre a tireoidite e o desenvolvimento do carcinoma. No entanto, necessita-se de mais estudos, seccionais ou de coorte, para essa comprovação.

Palavras-chave: Glândula Tireoide/Patologia; Tireoidite; Doença de Hashimoto; Carcinoma; Dados Demográficos; Pesquisa Biomédica; Diagnóstico Clínico; Análise Quantitativa

¹Acadêmico de Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

²Acadêmico de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

³Médica Patologista do Hospital São Rafael, Salvador, Bahia.

⁴Mestre em Medicina, Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

Trabalho realizado no Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Rafael.

Endereço para correspondência: Murilo Pedreira Neves. Av. São Rafael, 2.152 - São Marcos - Salvador (BH), Brasil. E-mail: murilo.neves@hsr.com.br

INTRODUÇÃO

O carcinoma papilífero é a forma mais comum de câncer da tireoide e apresenta o melhor prognóstico dentre as demais neoplasias malignas tireoidianas^{1,2,3}. São mais frequentes na população dos 20 aos 40 anos, ocorrendo numa prevalência duas vezes e meia maior em mulheres do que em homens; em crianças, o carcinoma papilífero corresponde a 90% dos casos de câncer da tireoide^{1,3,4,5,6}.

A incidência de carcinoma papilífero da tireoide vem aumentando em todo o mundo^{7,8}. No Brasil, esses números são proporcionais, ocorrendo 66 novos casos em cada 100.000 habitantes por ano⁹.

Fatores ambientais, em especial a deficiência de iodo, têm importante papel na patogênese desse tumor^{2,9}. Outros fatores, como a radioterapia externa na infância e adolescência, exposição à radiação ionizante, doença tiroideana preexistente e fatores genéticos, entre eles mutação de *RAS*, proteína *ERK* e rearranjos do *RET/PTC* estão associados com o aumento do desenvolvimento do carcinoma papilífero^{1,10}.

A tireoidite de Hashimoto ou tireoidite linfocítica crônica é uma doença autoimune caracterizada por infiltrado linfo-plasmocitário no parênquima tireoidiano, elevação do hormônio tireoide-estimulante, e diminuição dos hormônios tireoidianos (T3 e T4)^{4,5,11,12,13}.

Essa desordem é mais prevalente entre os 45 a 60 anos de idade e é mais comum em mulheres com uma predominância de dez a 20 casos femininos para um masculino; apesar de ser uma doença de "mulheres maduras", é a principal causa de bócio e hipotireoidismo adquirido em crianças e adolescentes em áreas não endêmicas^{5,14}.

A tireoidite de Hashimoto resulta da incapacidade dos linfócitos T supressores em destruir clones de linfócitos sensibilizados por antígenos tireoidianos, com consequente citotoxicidade mediada por células *natural killer* e interação de linfócitos T auxiliares com linfócitos B, produzindo anticorpos contra componentes tireoidianos^{11,12}. Células da tireoide de pacientes com tireoidite de Hashimoto não são individualmente normais, expressam alterações de genes, entre eles: *ET/PTC*, *RAS* e *FAS*; este, implicado como mediador da morte das células apoptóticas, levando à depleção dos folículos, ao hipotireoidismo e ao processo destrutivo^{11,13,14}.

A associação entre a tireoidite de Hashimoto e carcinoma papilífero da tireoide parece intrigante, pois compartilham em diversos aspectos morfológicos, imuno-histoquímicos e biomoleculares^{15,16}.

Os carcinomas papilíferos expressam frequentemente rearranjos genéticos durante a transformação maligna,

exibindo expressão do *RET/PTC* e fusão de proteínas, sendo que, também, podem ser encontrados no tecido da tireoide dos pacientes com a doença inflamatória crônica como a tireoidite de Hashimoto^{2,17,18,19}. A observação da coexistência de infiltração de linfócitos na tireoide com o carcinoma papilífero sugere que antígenos expressados por células do tumor sejam responsáveis por induzir uma resposta imune antitumoral^{4,17,18}. Um fato muito relevante é que em pacientes que foram expostos à radiação atômica, como a que foi observada em *Chernobyl*, desenvolveram não somente *RET/PTC* com carcinoma papilífero, mais também tireoidite de Hashimoto²⁰.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi quantificar a coexistência da tireoidite de Hashimoto no carcinoma papilífero da tireoide, diagnosticado no serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Rafael, correlacionando-os com os dados demográficos, informações clínicas e diagnósticos anatomopatológicos prévios.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizado um estudo de série de casos, aprovado no Conselho de Ética do Hospital São Rafael (protocolo de nº 128/06), de pacientes com carcinoma papilífero da tireoide, em material histopatológico diagnosticado no Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Rafael de janeiro de 2000 a dezembro de 2007. Foram selecionados todos os casos com carcinoma papilífero da tireoide com e sem tireoidite de Hashimoto. Os critérios de exclusão foram aqueles com dados perdidos ou incompletos.

O estudo baseou-se na aplicação de um formulário aos casos de carcinoma papilífero da tireoide, visando a coletar os dados demográficos: idade, sexo, data do diagnóstico; informações clínicas, diagnóstico anatomopatológico. Em relação às informações clínicas, foram consideradas como nódulos as lesões menores que 2,0cm e como tumor os casos com diagnóstico de carcinoma papilífero da tireoide e lesões maiores que 2,0cm.

Em uma segunda etapa, as lâminas dos exames anatomopatológicos foram revisadas pelos dois patologistas deste estudo, em microscópio *Nikon Eclipse E-200*.

Os resultados dos formulários aplicados aos casos foram analisados após confecção do banco de dados no *software* SPSS versão 9. Foi procedida à análise descritiva de todas as variáveis, com o estudo do qui-quadrado, tendo como comparação significativa o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No período de 2000 a 2007, foram realizadas 1.142 tireoidectomias no Centro Cirúrgico do Hospital São Rafael. Destes casos, foram selecionados aqueles com diagnóstico de carcinoma papilífero, perfazendo um total de 347. Foram excluídos três casos de doença metastática para a tireoide. Destes, 238 casos não apresentavam coexistência de carcinoma papilífero da tireoide e tireoidite de Hashimoto (68,6%), enquanto 109 casos apresentavam a referida coexistência (31,4%) Gráfico 1.

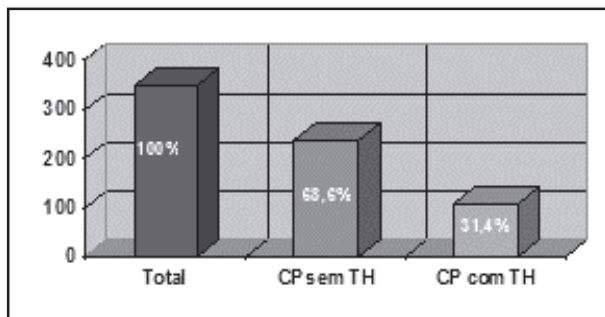


Gráfico 1. Frequência de tireoidite de Hashimoto (TH) no carcinoma papilífero

Total de Pacientes com Carcinoma Papilífero

CP sem TH - Carcinoma Papilífero da Tireoide sem Tireoidite de Hashimoto

CP com TH - Carcinoma Papilífero da Tireoide com Carcinoma Papilífero

Com relação aos dados demográficos presentes nos 347 prontuários de pacientes com carcinoma papilífero da tireoide, 288 (83%) casos eram do sexo feminino e 59 (17%) casos do sexo masculino. Dos casos sem a coexistência do carcinoma papilífero da tireoide e tireoidite de Hashimoto, foram encontrados 192 (80,6%) do sexo feminino e 46 (19,3%) do sexo masculino; e, nos casos com coexistência, foram encontrados 96 (88,1%) do sexo feminino e 13 (11,9%) do sexo masculino (Tabela 1). Mostrando que não há significância estatística ($p=0,21$), através do estudo do qui-quadrado da variável sexo, no carcinoma papilífero com e sem a tireoidite de Hashimoto (Tabela 1).

A média de idade dos casos de carcinoma papilífero foi de 42,5 anos. Nos casos com a coexistência, a média foi de 42,8 anos e nos casos sem a coexistência, a média foi de 41,7 anos. A idade mínima foi de 18 anos e máxima de 77 anos.

Com relação aos dados de informação clínica pré-operatória presentes nos prontuários que caracterizavam os casos de carcinoma papilífero da tireoide, observou-se um total de 220 casos com nódulo; destes, 151 (68,4%) foram encontrados nos casos de carcinoma papilífero sem tireoidite de Hashimoto e 69 (31,3%) nos casos com tireoidite de Hashimoto (Tabela 2). Os casos de bócio adenomatoso corresponderam a um total de 62 dos casos, sendo que 41 (66,1%) foram encontrados nos casos de carcinoma papilífero sem tireoidite de Hashimoto e 21 (33,9%) nos casos com tireoidite de Hashimoto (Tabela 2).

Em relação aos casos já diagnosticados definitivamente como tumor, foi encontrado um total de 41 casos; destes, 31 (75,6%) surgiram nos casos de carcinoma papilífero sem a coexistência da tireoidite de Hashimoto e dez (24,4%) nos casos com a coexistência de tireoidite de Hashimoto (Tabela 2).

Entre os 347 casos de carcinoma papilífero da tireoide, 24 deles não apresentavam registro de informações clínicas, sendo que em 15 (6,3%) não havia a coexistência e em 9 (3,7%) havia a coexistência (Tabela 2). Não houve significado estatístico ($p=0,96$), através do estudo do qui-quadrado das informações clínicas avaliadas no grupo do carcinoma papilífero com e sem a tireoidite de Hashimoto.

DISCUSSÃO

Relatos da primeira coexistência de carcinoma papilífero da tireoide com a tireoidite de Hashimoto remontam desde a década de 1980 com o trabalho de Strauss (1983). Posteriormente, houve novos trabalhos que indicavam a existência de associação como Replinger (2008), Cipolla (2005), e um dos poucos trabalhos brasileiros com o artigo de Roberti (2006)^{4,15,21,22}. O presente estudo mostrou uma

Tabela 1. Distribuição dos casos de carcinoma papilífero em relação ao gênero

Carcinoma papilífero da tireoide					
	Sem tireoidite de Hashimoto		Com tireoidite de Hashimoto		Total
		(%)		(%)	
Sexo masculino	46	19,3	13	11,9	59
Sexo feminino	192	80,6	96	88,1	288
Total	238		109		347

$p=0,22$

Tabela 2. Distribuição dos casos de carcinoma papilífero em relação às informações clínicas

Carcinoma papilífero da tireoide					
	Sem tireoidite de Hashimoto		Com tireoidite de Hashimoto		Total
		(%)		(%)	
Nódulo	151	63,4	69	63,3	220
Bócio Adenomatoso	41	17,2	21	19,3	62
Tumor	31	13,1	10	9,2	41
Sem informações clínicas	15	6,3	9	8,2	24
Total	238		109		347

coexistência de 31,4% de tireoidite de Hashimoto em casos de pacientes com carcinoma papilífero da tireoide (Gráfico 1), confirmando resultados já previamente estabelecidos por outros artigos. A fisiopatologia possível para explicar esses achados inclui: o mecanismo molecular patológico do *RET/PTC* que ainda não foi totalmente desvendado, conquanto o *RET/PTC* resulta de rearranjo cromossômico caracterizado pela fusão do *RET-tirosina quinase* na região 5'-terminal de genes heterogêneos^{2,19}. Esse rearranjo é marcador útil para ativação oncogênica das células folicular tireoidiana^{5,19}. Esse também pode ser encontrado no tecido da tireoide dos pacientes com tireoidite de Hashimoto em 68% das vezes, relatado no estudo Rhoden (2006)^{5,21,23}. O *RET/PTC* leva à expressão de *RP3* no tecido da tireoide fornecendo antígenos e estimulando a quimiotaxia para que os monócitos e os linfócitos infiltrem o tecido, evocando uma forte resposta imunológica^{2,17}. Assim, a expressão de *RP3* no tecido da tireoide dos pacientes com doença neoplásica suporta um modelo de autoimunidade, por meio do qual a imunogenicidade do órgão é uma consequência da transformação oncogênica, tendo por resultado o desenvolvimento da inflamação crônica; além disso, as células da tireoide que expressam *RP3* secretam um número grande de citocinas inflamatórias e induzem a transformação com contorno irregular do núcleo da célula, como também do citoesqueleto^{19,22,23}.

A coexistência observada na nossa série de casos sugere uma relação não apenas casual, mas possivelmente a presença de um processo inflamatório crônico com ativação de genes relacionados à multiplicação celular poderia ser mais um fator para a transformação maligna, como se observam em outros tumores malignos precedidos por inflamação crônica, tais como o câncer gástrico e os tumores de cólon associados às doenças inflamatórias intestinais crônicas.

As diferenças entre as médias de idade encontradas nos casos com e sem a coexistência da tireoidite de

Hashimoto não foram significativas, muito próximo do que foi visto na maioria dos dados da literatura, nos quais variou dos 20 a 50 anos. Pode ter havido mudança no valor real desse dado, pois neste trabalho não foram acrescidos os pacientes menores de 18 anos, tendo em vista que a relação entre o carcinoma papilífero da tireoide e a tireoidite de Hashimoto se mostra totalmente diferente dos casos em adultos e desse modo poderia interferir nas outras variáveis pesquisadas.

Em relação à distribuição demográfica nos casos de carcinoma papilífero da tireoide com e sem tireoidite de Hashimoto, foi observada uma predominância do sexo feminino, o que está de acordo com os dados consultados da literatura. Dos 109 casos observados com a presença da coexistência de carcinoma papilífero e tireoidite de Hashimoto no sexo feminino, houve um total de 96 (88,1%) casos, o que não tem significância estatística $p=0,21$ quando comparados com os casos sem coexistência (238 casos) e, destes, 192 (80,6%) foram do sexo feminino; porém, do ponto de vista clínico, a frequência maior em mulheres pode ser explicada por uma série de fatores; entre eles, os carcinomas da tireoide, as doenças autoimunes (incluído aqui a tireoidite de Hashimoto), que são mais frequentes no sexo feminino, contribuindo para esse aumento de casos na coexistência. E isso, pode-se dever à associação de fatores genéticos, ambientais, e fatores endógenos; entre eles, as flutuações hormonais e a gravidez^{24,25}. Sabe-se que, durante a gravidez, pode ocorrer acúmulo de células fetais na tireoide materna e essas podem estar envolvidas no desencadear do processo autoimune²⁵. Foi também observada uma frequência três vezes maior em mulheres de carcinoma papilífero da tireoide que está compatível com dados da literatura; porém houve sete vezes mais prevalência em mulheres nos casos com a coexistência de tireoidite de Hashimoto. O que reforça a ideia de uma relação entre doença autoimune, inflamatória, e

o desenvolvimento de neoplasia maligna epitelial. Essa inferência não pode ser confirmada, pois ainda não existem dados suficientes para elucidar se há ou não fatores genéticos, ambientais, hormonais e associações ainda não descritos.

Dos dados de informações clínicas obtidos nos prontuários não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,96$), tanto nos casos de nódulo, bócio adenomatoso e tumor quando comparados com indivíduos com tireoidite e sem tireoidite de Hashimoto. Esses dados, no entanto, confirmam um maior número de casos com diagnóstico de nódulo (220 dos 347 casos avaliados), muito parecidos com dados encontrados no meio científico.

A presença de nódulo tireoideo na população geral é um achado bastante comum, principalmente no sexo feminino (aproximadamente seis mulheres para cada homem) e é um fator que aumenta com a idade^{1,2}. Constitui um desafio para o clínico, pois pode representar desde uma alteração totalmente benigna, sem repercussão para o seu portador, até um câncer agressivo e fatal. O diagnóstico precoce é fundamental para o resultado final do tratamento, pois quando descoberto em fase inicial o carcinoma papilífero apresenta elevado índice de cura. Isso leva à necessidade de investigação através da ultrassonografia, punção aspirativa por agulha fina, cintilografia, lobectomia ou tireoidectomia, para que se possam prevenir casos mais graves com complicações a distancia.

Ainda não está claro se a coexistência da tireoidite de Hashimoto denota pior prognóstico da neoplasia tireoidiana e estudos posteriores devem ser realizados, visando a determinar a evolução da doença que, a princípio, poderia ter sido desencadeada pela inflamação crônica da tireoide^{4,15}.

CONCLUSÃO

A série de casos apresentada mostrou uma frequência de 31,4% de tireoidite de Hashimoto nos casos de carcinoma papilífero da tireoide, sugerindo uma associação não apenas casual e que levanta a possibilidade de uma relação de causa e efeito entre a tireoidite de o desenvolvimento do carcinoma. Em relação à associação aos fatores epidemiológicos e informações clínicas, foram observados: maior frequência de casos no sexo feminino; maior número de nódulos na população estudada, no entanto sem significância estatística. Ainda, necessita-se de mais estudos, seccionais ou de coorte, para essa comprovação.

Declaração de Conflito de Interesses: Nada a Declarar.

REFERÊNCIAS

1. Coeli CM, et al. Incidência e mortalidade por câncer de tireoide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;4: 503-9.
2. Cotran, RS, Kumar V, Abbas F. O sistema endócrino. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Abbas F. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.1011-47.
3. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE. Rising thyroid cancer incidence in the united states by demographic and tumor characteristics. 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 Feb 24.
4. Repplinger D, Bargren A, Zhang YW, Adler JT, Haymart M, Chen H. Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *J Surg Res* 2008 nov;150(1):49-52. Epub 2007 Oct 29.
5. Rosai JMD. Thyroid gland. In: Rosai JMD, Ackerman LV. *Surgical pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2004. v. 1. p.515-94
6. Stein K, Smith T, Kim Y, Mehta CC, Stafford J, Spillers RL, Baker F. The American Cancer Society's Studies of Cancer Survivors. *Cancer Nurs* 2006;29:83-5.
7. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;27:19075-80.
8. Leboulleux S, Rubino C, Baudin E, Caillou B, Hartl DM, Bidart JM, Travagli JP, Schlumberger M. Prognostic factors for persistent or recurrent disease of papillary thyroid carcinoma with neck lymph node metastases and/or tumor extension beyond the thyroid capsule at initial diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5723-9.
9. Golbert L, Wajner SM, Rocha AP, Maia AL, Gross JL. Carcinoma diferenciado de tireoide: avaliação inicial e acompanhamento. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49: 701-10.
10. Kang DY, Kim KH, Kim JM, Kim SH, Kim JY, Baik HW, ET.al. High prevalence of RET, RAS, and ERK expression in Hashimoto's thyroiditis and in papillary thyroid carcinoma in the Korean population. *Thyroid* 2007 Nov;17(11):1031-8.
11. Harii N, Lewis CJ, Vasko V, McCall K, Benavides-Peralta U, Sun X, Ringel MD, Saji M, Giuliani C, Napolitano G, Goetz DJ, Kohn LD. Thyrocytes express a functional toll-like receptor 3: overexpression can be induced by viral infection and reversed by phenylmethimazole and is associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *Mol Endocrinol* 2005;19:1231-50.
12. Szeliga DVM, et al. Tireoidite de Hashimoto na infância e na adolescência, estudo retrospectivo de 43 Casos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46: 150-4.

13. WEI W.Z. Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+ CD25+ regulatory T cell-depleted mice. *Cancer Res* 2005;65: 8471-8.
14. Zhang ZL, Lin B, Yu LY, Guo LH. CMV-hFasL transgenic mice prevent from experimental autoimmune thyroiditis. *Chin Med J* 2005;118:1087-92.
15. Cipolla C, Sandonato L, Graceffa G, Fricano S, Torcivia A, Vieni S, Latteri S, Latteri MA. Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid carcinoma. *Am Surg* 2005;71:874-8.
16. Benvenga S. Update on thyroid cancer. *Horm Metab Res* 2008 May;40(5):323-8.
17. Fusco A, Santoro M. 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007 Jul;51(5):731-5.
18. Del RP, et al. The association between papillary carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis: does it modify the prognosis of cancer?. *Minerva Endocrinol.* 2008 Mar;33(1):1-5.
19. Nikiforov YE. RET/PTC Rearrangement--a link between Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer...or not. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 Jun; 91(6):2040-2.
20. Lima J, et.al. BRAF Mutations Are Not a Major Event in Post-Chernobyl Childhood Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* Sep 2004; 89: 4267 -71.
21. Roberti A, Andrade SJ, Denardin OVP, Rapoport A. Concomitance of Hashimoto's thyroiditis and differentiated thyroid cancer. *Revista do Cole'gio Brasileiro de Cirurgio-es* 2006;33(6): 345-9.
22. Strauss M, Laurian N, Antebi E. Coexistent carcinoma of the thyroid gland and Hashimoto's thyroiditis. *Surg Gynecol Obstet* 1983;157(3):228-32.
23. Rhoden K, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, et.al. RET/Papillary Thyroid Cancer Rearrangement in Nonneoplastic Thyrocytes: Follicular Cells of Hashimoto's Thyroiditis Share Low-Level Recombination Events with a Subset of Papillary Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* Jun 2006; 91: 2414 - 23.
24. Steiner M. Women's mental health: what don't we know?. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2005;27(Supl II):S41-2.
25. Miguel M. Tireoidites Auto-imunes. *Acta Med Port* 2006;19: 387-94.

Abstract

This study had the objective of quantify the coexistence of Hashimoto's thyroiditis and papillary carcinoma thyroid, correlating with demographic data, and previous clinical presentation and pathological anatomy diagnosis. A case series study of 347 reports patients with thyroid papillary carcinoma diagnosed at Pathology Anatomy and Cytopathology department at São Rafael Hospital from January 2000 to December 2007. Forms were filled on the cases in order to collect demographic and clinical data. The pathological anatomy examinations were diagnosed by both pathologists of the present study. The present study showed a coexistence of 31.4% of Hashimoto's thyroiditis in reports of patients with papillary thyroid carcinoma. In females, there was a total of 96 (88.1%) cases with coexistence, which shows higher prevalence when compared with cases without coexistence. The case series studied presented a frequency of 31.4% of Hashimoto's thyroiditis in cases with papillary thyroid carcinoma suggesting an association not just coincidental and that raises the possibility of a relation of cause and effect between the thyroiditis of the development of carcinoma. But further cross sectional or cohort studies are necessary to confirm this information.

Key words: Thyroid Gland/Pathology; Thyroiditis; Hashimoto Disease; Carcinoma; Demographic Data; Biomedical Research; Diagnosis, Clinical; Quantitative Analysis

Resumen

El objetivo del estudio fue cuantificar la coexistencia de la tiroiditis de Hashimoto en el carcinoma papilar de tiroides, en correlación con los datos demográficos, informaciones clínicas y diagnósticos anatomopatológicos previos. Se llevó a cabo un estudio de serie de 347 casos de pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma papilar de tiroides, en el servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital San Rafael, de enero de 2000 a diciembre de 2007. Se hicieron aplicaciones de formularios para los casos, para recoger los datos demográficos e informaciones clínicas, los exámenes anatomopatológicos fueron diagnosticados por los dos patólogos de este estudio. El estudio presentó una coexistencia de 31,4% de tiroiditis de Hashimoto en pacientes con carcinoma papilar de tiroides. Para el sexo femenino se obtuvo un total de 96 casos (88,1%), lo que demuestra una mayor frecuencia en comparación con los casos sin coexistencia. La serie de casos presentada manifestó una frecuencia de 31,4% de tiroiditis de Hashimoto en los casos de carcinoma papilar de tiroides, lo que sugiere una asociación no sólo ocasional, sino que plantea la posibilidad de una relación de causa y efecto entre la tiroiditis y el desarrollo del carcinoma. Sin embargo, hacen falta más estudios, de sección o de cohorte, para esta comprobación.

Palabras clave: Glándula Tiróides/Patología; Tiroiditis; Enfermedad de Hashimoto; Carcinoma; Datos Demográficos; Investigación Biomédica; Diagnóstico Clínico; Análisis Cuantitativo

Carcinoma papilífero da tireoide e suas variantes histológicas associados à tireoidite de Hashimoto

Primeira submissão em 07/05/09
Última submissão em 08/07/09
Aceito para publicação em 25/08/09
Publicado em 20/10/09

Thyroid papillary carcinoma and histologic variants linked to Hashimoto disease

Murilo Pedreira Neves Junior¹; Marcos Pedro Guedes Camandaroba²;
Marco Antônio Cardoso de Almeida³; Julia Souto Miranda⁴

unitermos	resumo
Tireoide	<p>Introdução e objetivo: A associação entre o carcinoma papilífero da tireoide e suas variantes e a tireoidite de Hashimoto (TH) é bastante questionada no meio científico, pois compartilham diversos aspectos morfológicos, imuno-histoquímicos e biomoleculares. Os tumores da tireoide representam mais de 90% de todos os cânceres endócrinos e são caracterizados por alterações genéticas, entre as quais envolvem RET (rearranjos) e BRAS, RAS, P53 (mutações). Já a TH é uma doença autoimune, caracterizada por falência tireoidiana secundária à destruição autoimune e que apresenta alterações de genes, entre eles RET/PTC, RAS e FAS. O objetivo deste trabalho é descrever a associação do carcinoma papilífero da tireoide com a TH, correlacionando-os com os dados demográficos e suas variantes histológicas.</p> <p>Método: Realizou-se um estudo de série de 466 casos de pacientes com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma papilífero da tireoide de 2000 a dezembro de 2008. Foram feitas aplicações de formulários aos casos, visando coletar os dados demográficos e suas variantes. Resultados: O estudo apresentou uma coexistência de 30% de TH em pacientes com carcinoma papilífero da tireoide. No sexo feminino, houve maior número de casos no grupo com TH, valor de $p = 0,046$. Conclusão: A série de casos apresentada mostrou frequência de 30% de TH nos casos de carcinoma papilífero da tireoide, sugerindo uma associação, não apenas casual, que levanta a possibilidade de uma relação de causa e efeito entre tireoidite e desenvolvimento do carcinoma.</p>
Patologia	
Carcinoma	
Tireoidite	
Hashimoto	

abstract

key words

Introduction and objective: The association between papillary thyroid carcinoma and its variants and Hashimoto's thyroiditis is widely questioned in the scientific area, as they both share several morphologic, immunohistochemical and biomolecular aspects. Thyroid tumors represent over 90% of all endocrine cancers and are characterized by genetic changes involving RET (rearrangements) and BRAS, RAS, P53 (mutations). Whereas Hashimoto's thyroiditis is an autoimmune disease characterized by auto-immune destruction followed by thyroid failure and it presents RET/PTC, RAS and FAS alterations. This study aims to describe the association of Hashimoto's thyroiditis with papillary carcinoma thyroid, correlating them with demographic data and histological variants. **Methods:** It was conducted a case series study of 466 patients diagnosed with thyroid papillary carcinoma from January 2000 to December 2008. Case forms were filled up with the aim to collect demographic data and histological variants. **Results:** The present study showed a coexistence of 30% of Hashimoto's thyroiditis in patients with papillary thyroid carcinoma. Among female patients there was a higher number of Hashimoto's thyroiditis cases, $p = 0.046$. **Conclusion:** The case series study showed a frequency of 30% of Hashimoto's thyroiditis in cases with papillary thyroid carcinoma suggesting a non-coincidental association, which raises the possibility of a cause and effect relation between thyroiditis and carcinoma development.

Thyroid
Pathology
Carcinoma
Thyroiditis
Hashimoto

¹Médico anatomopatologista; mestre em Medicina Interna.

²Acadêmico de Medicina pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

³Mestre em Medicina; professor assistente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (UFBA); chefe do Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Rafael.

⁴Médica anatomopatologista do Hospital São Rafael.

Introdução

Os tumores da tireoide representam mais de 90% de todos os cânceres endócrinos, sendo o carcinoma papilífero a sua forma mais comum e de melhor prognóstico^(20, 24).

São caracterizados por alterações genéticas diferentes, entre as quais envolvem RET e TRK (rearranjos), BRAS, RAS e P53 (mutações)^(6, 7, 11, 20). A alteração da proteína RET é das mais importantes, pois pode ser encontrada no tecido da tireoide de pacientes com doença inflamatória crônica, como a tireoidite de Hashimoto (TH)^(3, 16, 27).

O carcinoma papilífero é definido como uma combinação de características morfológicas, entre elas o núcleo com contorno irregular, fendido, contendo inclusões, além de dispersão periférica de agregados de cromatina. Suas principais variantes histopatológicas são: variantes clássica, folicular, de células altas, de células colunares, sólida (esclerosante) e microcarcinoma papilífero^(1, 5, 15).

Cada uma dessas variantes apresenta fenótipos diferenciados, com alterações nas taxas de morbidade e mortalidade⁽¹⁴⁾. As de maior agressividade incluem as variantes de células altas, sólida e de células colunares, sendo esta a mais grave, principalmente por invasão de linfonodos linfáticos, rápido crescimento, altas taxa de recorrência local e metástases para pulmão, cérebro e osso^(12, 14).

A TH é uma doença autoimune, caracterizada por falência tireoidiana gradual secundária à destruição autoimune^(5, 26). Essas células tireoidianas não são individualmente normais e expressam alterações de genes, entre eles RET/PTC, RAS e FAS, implicados na alteração de função e morte celular^(10, 28).

A glândula tireoide macroscopicamente se revela aumentada de tamanho, a cápsula está quase sempre intacta e por vezes nodular; microscopicamente há extensa infiltração linfocitária do parênquima com pequenos linfócitos, plasmócitos⁽⁵⁾.

A associação entre o carcinoma papilífero e suas variantes e a TH é bastante questionada no meio científico, pois compartilham diversos aspectos morfológicos, imuno-histoquímicos e biomoleculares^(2, 4).

Os carcinomas papilíferos expressam frequentemente rearranjos genéticos durante a transformação maligna, exibindo expressão do RET/PTC e fusão de proteínas,

sendo que também podem ser encontrados no tecido com a TH^(1, 6, 9). Esse fato foi observado inicialmente em pacientes expostos à radiação atômica do acidente de Chernobyl⁽²⁶⁾. A observação da presença de infiltração linfocitária na tireoide com carcinoma papilífero sugere que antígenos expressados por células do tumor sejam responsáveis por induzir uma resposta imune antitumoral^(6, 9, 21).

Objetivo

O objetivo deste trabalho é descrever a associação do carcinoma papilífero da tireoide com a TH, diagnosticada no serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Rafael, correlacionando-os com os dados demográficos e as suas variantes histológicas.

Material e método

Foi realizado um estudo de casos, aprovado no conselho de ética do Hospital São Rafael, de pacientes com carcinoma papilífero da tireoide, em material histopatológico diagnosticado no serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital São Rafael, de janeiro de 2000 a dezembro de 2008. Foram selecionados todos os casos com carcinoma papilífero da tireoide com e sem TH. Os critérios de exclusão foram casos com dados perdidos ou incompletos.

O estudo baseou-se na revisão dos prontuários médicos e na aplicação de um formulário aos casos de carcinoma papilífero da tireoide, visando coletar dados demográficos, como idade, sexo, data do diagnóstico, e suas variantes encontradas no anatomopatológico. As variantes histológicas do carcinoma papilífero consideradas no trabalho foram: variante clássica, variante folicular, variante de células altas, variante de células clara e variante sólida, bem como microcarcinoma. Consideramos microcarcinoma as lesões com menos de 1 cm no maior diâmetro.

Em uma segunda etapa, as lâminas dos exames anatomopatológicos foram revisadas pelos dois patologistas deste estudo, em microscópio Nikon Eclipse E-200.

Os resultados dos formulários aplicados aos casos foram analisados após confecção do banco de dados no *software* SPSS versão 9. Foi procedida análise descritiva de todas

as variáveis com o estudo do qui-quadrado, tendo como comparação significativa o valor de $p < 0,05$.

Resultados

No período de 2000 a 2008, foram realizadas 1.438 tireoidectomias no centro cirúrgico do Hospital São Rafael. Foram selecionados 466 casos com diagnóstico de carcinoma papilífero. Desses, 140 apresentavam coexistência de carcinoma papilífero da tireoide e TH (30%), enquanto 326 casos não apresentavam tireoidite (70%). (Figura). Foram excluídos seis casos que apresentavam doença metastática para tireoide.

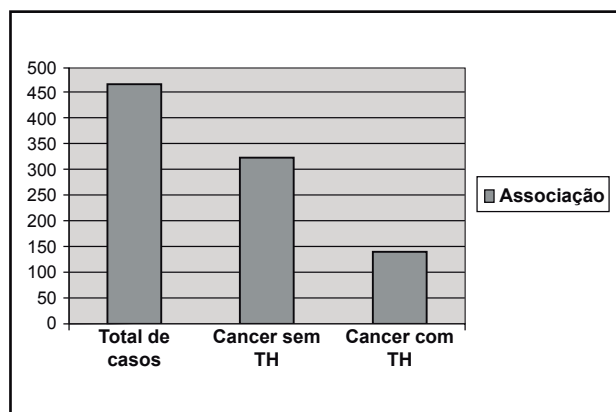


Figura – Frequência de TH no carcinoma papilífero
TH: tireoidite de Hashimoto.

Dos dados demográficos presentes nos 466 prontuários de pacientes com carcinoma papilífero da tireoide, 392 (84,1%) eram do sexo feminino e 74 (15,9%), do sexo masculino. Dos casos sem a coexistência do carcinoma papilífero da tireoide e TH, foram encontrados 267 (68,1%) do sexo feminino e 59 (79,7%) do sexo masculino, já nos casos com coexistência foram encontrados 125 (31,8%) do sexo feminino e 15 (20,2%), do sexo masculino (**Tabela 1**), mostrando que houve significância estatística ($p = 0,046$) por meio do teste do qui-quadrado da variável sexo no carcinoma papilífero com e sem presença de TH. (**Tabela 2**).

A média de idade dos 466 casos de carcinoma papilífero foi de 41,3 anos. Nos casos com a coexistência, a média foi de 44,8 anos e, nos casos sem a coexistência, de 40,7. A idade mínima foi de 18 anos e a máxima, de 77.

Tabela 1 Distribuição dos casos de carcinoma papilífero com relação ao sexo

	Carcinoma papilífero da tireoide		Total
	Sem TH (%)	Com TH (%)	
Sexo masculino	59 79,7	15 20,2	74
Sexo feminino	267 68,1	125 31,8	392
Total	326 -	140 -	466

TH: tireoidite de Hashimoto.

Tabela 2 Distribuição dos casos das variantes do carcinoma papilífero com e sem TH

Variantes	Carcinoma papilífero da tireoide		Total
	Sem TH (%)	Com TH (%)	
Microcarcinoma	141 43,2	70 50	211
Clássica	134 41,1	52 37,1	186
Folicular	49 15	18 12,8	67
Sólida	2 0,5	0 0	2
Total	326 -	140 -	466

TH: tireoidite de Hashimoto.

As variantes histológicas observadas nos 466 casos de carcinoma papilífero foram 211 (45,3%), com variante microcarcinoma, 186 (39,9%) apresentavam variante clássica, 67 (14,4%), variante folicular e duas (0,4%), variante sólida. Não foram evidenciados casos de variante de células altas nem de células claras.

Associando-se as variantes do carcinoma papilífero com a TH, foi constatado que dos 211 casos da variante microcarcinoma 141 (43,2%) não apresentavam a coexistência, e em 70 (50%) havia coexistência. Entre variante clássica e TH, 134 (41,1%) apresentavam coexistência e em 52 (37,1%) não havia coexistência. Nos casos com a variante folicular, 49 (15%) possuíam a coexistência e 18 (12,8%) não a possuíam. Na variante sólida, nos únicos dois casos (0,5%) não havia coexistência da TH. Não houve significância estatística ($p = 0,47$) por meio do teste do qui-quadrado das variantes histológicas do carcinoma papilífero com e sem TH.

Discussão

Desde a década de 1980, já existem estudos nos quais se demonstrava a coexistência entre TH e carcinoma papilífero da tireoide⁽²⁵⁾. O presente estudo evidenciou uma coexistência de 30%, (Figura), resultado que ratifica estudos anteriormente relatados como Cipolla⁽⁴⁾ e Roberti^(4, 22). Isso sugere uma relação não apenas casual, mas possivelmente que a presença de processo inflamatório crônico com ativação de genes relacionados à multiplicação celular poderia ser mais um fator para a transformação maligna. Não há dados confirmatórios de sua fisiopatologia, no entanto, o que se tem investigado é o rearranjo cromossômico do RET/PTC, (fusão do RET-tirosina quinase na região 5-terminal de genes heterogêneos), marcador útil para ativação oncogênica das células foliculares tireoidianas, também encontrado no tecido da tireoide dos pacientes com TH em 68% das vezes, relatado no estudo Rhoden (2006)^(5, 19, 22, 23). O RET/PTC leva à expressão de RP3 no tecido da tireoide, fornecendo antígenos e estimulando a quimiotaxia para que monócitos e linfócitos infiltram o tecido, evocando forte resposta imunológica. Além disso, as células da tireoide que expressam RP3 secretam um número grande de citocinas inflamatórias e induzem a transformação com contorno irregular do núcleo da célula, como também do citoesqueleto^(5, 9, 23, 25).

Foi evidenciada predominância do sexo feminino, tanto no grupo de casos de carcinoma papilífero com tireoidite como no grupo de casos de carcinoma papilífero sem tireoidite; comparando-se os grupos, há um maior número de casos do sexo feminino com TH com relação ao grupo sem TH ($p = 0,046$). Do ponto de vista clínico, a frequência maior em mulheres pode ser explicada por uma série de fatores, entre eles doenças autoimunes (incluída aqui aTH), flutuações hormonais e gravidez, contribuindo possivelmente para esse aumento de casos de carcinoma na coexistência⁽¹⁸⁾. Sabe-se que, durante a gravidez, pode ocorrer acúmulo de células fetais na tireoide materna, que podem estar envolvidas no desencadear do processo autoimune⁽¹⁸⁾. Esses dados reforçam a ideia de uma relação causal entre doença autoimune, doença inflamatória e desenvolvimento de neoplasia maligna epitelial; no entanto, essa hipótese não pode

ainda ser confirmada, pois não existem dados suficientes para elucidar se há ou não fatores genéticos, ambientais, hormonais ou inflamatórios ainda não descritos.

Com relação à distribuição dos casos das variantes do carcinoma papilífero com e sem TH, foi observada distribuição equitativa de casos entre as três principais variantes mais comuns, sendo que não houve significância estatística ($p = 0,47$) para os grupos com e sem a coexistência, diferentemente dos dados da literatura, os quais evidenciaram maior número de casos de variante folicular no grupo das TH^(5, 12, 14). Inferiu-se que essa variante possui alterações genéticas mais frequentes do RET/PTC, com relação às variantes papilífera e micropapilífera, e que, desse modo, a TH seria causa dependente dessa alteração^(8, 17). Já no estudo de Basolo⁽¹⁾, a alteração do RET/PTC foi encontrada em qualquer variante do carcinoma papilífero da tireoide, sem diferenças entre si. No entanto, foi observado que as variantes com essa alteração possuem um prognóstico mais agressivo, com maior número de recorrência após tratamento^(1, 13).

Desse modo, ainda não está claro se a coexistência da TH denota pior prognóstico da neoplasia tireoidiana, e estudos posteriores devem ser realizados visando determinar a evolução da doença, que a princípio poderia ter sido desencadeada pela inflamação crônica da tireoide^(4, 21).

Conclusão

A série de casos apresentada mostra frequência de 30% de TH nos casos de carcinoma papilífero da tireoide, sugerindo uma associação, não apenas casual, que levanta a possibilidade de uma relação de causa e efeito entre tireoidite e desenvolvimento do carcinoma. Além disso, o maior número de casos de mulheres no grupo com Hashimoto sugere que há uma escala de evolução, na qual inicialmente ocorrem alterações autoimunes, com posterior transformação neoplásica das células tireoidianas. No entanto, ainda são necessários mais estudos, seccionais ou de coorte, comprobatórios dessa associação e também da relação com alguma das variantes histopatológicas.

Referências

1. BASOLO, F. *et al.* Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol*, v. 160, n. 1, p. 247-54, 2002.
2. BENVENGA, S. Update on thyroid cancer. *Horm Metab Res*, v. 40, n. 5, p. 323-8, 2008.
3. CAHILL, S. *et al.* Effect of ret/PTC 1 rearrangement on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer*, v. 11, n. 5, p. 70, 2006.
4. CIPOLLA, C. *et al.* Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid carcinoma. *Am Surg*, v. 71, p. 874-8, 2005.
5. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, F. O sistema endócrino, In: Robbins, SL, Contran, R.S, Kumar V, Abbas F. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 1011-47.
6. DEL RP, *et al.* The association between papillary carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis: does it modify the prognosis of cancer? *Minerva Endocrinol*, v. 33, n. 1, p. 1, 2008.
7. DELELLIS, R. Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol*, v. 94, n. 8, p. 662-9, 2006.
8. FINN, S. P. *et al.* Expression microarray analysis of papillary thyroid carcinoma and benign thyroid tissue: emphasis on the follicular variant and potential markers of malignancy. *Virchows Arch*, v. 450, n. 3, p. 249-60, 2007.
9. FUSCO, A.; SANTORO, M. 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 51, n. 5, p. 731-5, 2007.
10. HARII, N. *et al.* Thyrocytes express a functional toll-like receptor 3: overexpression can be induced by viral infection and reversed by phenylmethimazole and is associated with Hashimotos autoimmune thyroiditis. *Mol Endocrinol*, v. 19, p. 1231-50, 2005.
11. HE, H. *et al.* The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 27, p. 19075-80, 2005.
12. HUANG, W.T. *et al.* Encapsulated columnar-cell carcinoma of the thyroid: a case report. *Kaohsiung J Med Sci*, v. 21, n. 5, p. 241-4, 2005.
13. JUKKOLA, A. *et al.* Prognostic factors in differentiated thyroid carcinomas and their implications for current staging classifications. *Endocr Relat Cancer*, v. 11, n. 3, p. 571-9, 2004.
14. JUNG, T. *et al.* Clinical features and prognostic factors for survival in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma and comparison to the patients with the aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocr J*, v. 54, n. 2, p. 265-74, 2007.
15. KAKUDO, K. *et al.* Papillary carcinoma of the thyroid in Japan: subclassification of common type and identification of low risk group. *Journal of Clinical Pathology*, v. 57, p. 1041-6, 2004.
16. MACIEL, R.; KIMURA, E.; CERUTTI, M. Patogênese dos tumores diferenciados da tireoide (papilífero e folicular). *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 49, p. 691-700, 2005.
17. MAXWELL, E. L.; PALME, C. E.; FREEMAN, J. Hürthle cell tumors: applying molecular markers to define a new management algorithm. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 132, n. 1, p. 54-8, 2006.
18. MIGUEL, M. Tireoidites Autoimunes. *Acta Med Port*, v. 19, p. 387-94, 2006.
19. NIKIFOROV, Y. E. RET/PTC Rearrangement-a link between Hashimotos thyroiditis and thyroid cancer... or not. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2040-2, 2006.
20. PRODOSMO, A. *et al.* Analysis of human MDM4 variants in papillary thyroid carcinomas reveals new potential markers of cancer properties. *J Mol Med*, v. 86, n. 5, p. 585-96, 2008.
21. REPPLINGER, D. *et al.* Is Hashimotos thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *J Surg Res*, v. 150, n. 1, p. 49-52, 2008.
22. ROBERTI, A. *et al.* Concomitance of Hashimotos thyroiditis and differentiated thyroid cancer. *Rev Col Bras Cir*, v. 33, n. 6, p. 345-9, 2006.
23. RHODEN, K. J. *et al.* RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimotos thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2414-23, 2006.
24. STABENOW, E. *et al.* Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. *Clinics (São Paulo, Brazil)*, v. 60, p. 233-40, 2005.
25. STRAUSS, M.; LAURIAN, N.; ANTEBI, E. Coexistent carcinoma of the thyroid gland and Hashimotos thyroiditis. *Surgery Gynecology & Obstetrics*, v. 157, n. 3, p. 228-32, 1983.
26. TOMER, Y. *et al.* Common and unique susceptibility loci in Graves and Hashimoto diseases: results of whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families. *American Journal of Human Genetics*, v. 73, p. 736-47, 2003.
27. UNGER, K. *et al.* Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, n. 9, p. 4272-9, 2004.
28. WEI, W. Z. Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+ CD25+ regulatory T cell-depleted mice. *Cancer Res*, v. 65, p. 8471-8, 2005.

Endereço para correspondência

Murilo Pereira Neves
Hospital São Rafael
Avenida São Rafael, 2.152 – São Marcos-BA
Tel./Fax: (71) 3399-6331
e-mail: murilo.neves@hsrc.com.br

Expression of FOXP3 in the papilliferous carcinoma of the thyroid gland

FOXP3 Expression in Papillary Thyroid Cancer.

Murilo Pedreira Neves Junior I; Thaizza Cavalcante Correia II; Milena Brachmans Mascarenhas III; Marcos Pedro Camandaroba IV; Edgar M. Carvalho V

I Anatomopathologist; Master in Internal Medicine;

II Medical Student at the Federal University of Bahia (UFBA);

III Medical Student at the Bahia School of Medicine and Public Health (EBMSP)

IV Resident Doctor at the Hospital of the Public Resident in São Paulo.

V

Mail Address:

Murilo Pedreira Neves Jr

University Hospital Prof. Edgard Santos

João das Botas Street – No Number

Salvador-BA

Phone number/ Fax: (71) 33675936

E-mail: murilo.neves@hotmail.com

Introduction

Tumors in the thyroid gland are common in the population with ages varying from 20 to 60 years old and around forty percent (40%) of them show thyroidean nodules (Saleh *et al.* 2010). Only 5-10% of the nodules in the thyroid gland are malignant, being the most common of them the papilloma thyroid carcinoma (PTC) (Vierlinger *et al.* 2011). The incidence of cancer in the thyroid gland doubled in the last 30 years and it is probably due to the increase of the detection of nodules that are still small and of low risk (Vines *et al.* 2011). With better techniques of diagnosis, PTC can be identified more frequently than as it used to be in the past (Eze *et al.* 2011), and it is today the most common type of malignant endocrine neoplasia, being responsible for more than 70% of all the thyroid cancer (Khanafshar *et al.* 2011). The incidence of PTC has increased along the last twenty years, especially in the developed countries (Khanafshar *et al.* 2011). PTC's etiology is related with environmental, genetic and hormonal factors (Lloyd *et al.* 2011). The association between PTC and Hashimoto's thyroiditis (HT) has been studied because both diseases share many morphological, immunohistochemical and molecular characteristics (Benvenga S; Cipolla C.). Additionally, it has been suggested that the chronic inflammatory process that is present in HT, could contribute to the activation of genes that would become a factor for the malignant transformation (Cipolla C, Cotran RS, Strauss M.)

The chromosomal rearrangement RET/PTC (a fusion of RET thyroxin kinase – 5 in the terminal region of heterogeneous genes) is an indicator of oncogenic activation of follicular cells of the thyroid, being able to be documented in up to sixty-eight per cent (68%) of the cases of PTC (2006). However, this rearrangement can also be found in HT (Cotran RS, Nikiforov YE, Roberti A et al). RET/PTC leads to the expression of RP3 in tissues of the thyroid and it is a chemotactic factor for monocytes and lymphocytes, which evokes a strong inflammatory response (Nikiforov YE, Rhoden KJ et al.). Also, the thyroid cells that express RP3 secrete inflammatory cytokines and induce the

neoplastic transformation (Strauss M, Cotran RS, Rhoden KJ et al.; Fusco, A).

FOXP3 (*Foxhead Box Protein 3*) belongs to the Family of regulators of the *forkhead/winged-helix* transcription, which is involved in the regulation of the development of the immune system, (Ladoire S) as well as in its function, (Merlo A, Fontenot JD) and it is codified by a gene that has a central role in the development of regulatory T cells (Tregs) (Hori S). Usually FOXP3 can be found in Tregs cells whose function is the one of controlling the cellular multiplication and activation (Ghebeh H). The low expression of FOXP3 predisposes to self-immune diseases as HT (Zhou X, Bucktrout SB). FOXP3 is also expressed in non-lymphocyte cancerous cells (Ladoire S, Martin F), which suggests that this marker can have a broader meaning in carcinogenesis (Martin F). FOXP3 is expressed in many malignant neoplasias as lung, breast, colon, melanoma and leukemia (Karanikas V). It is admitted that FOXP3 could be a factor for the beginning of cancer, as well as, of perpetuation of neoplastic proliferation (Ladoire S). Also FOXP3 is related to the recurrence of cancer and to the metastatic disease (Schreiber TH). In this context the better understanding of the role of this protein in cancer, can allow its use as a biomarker and a possible prognostic factor; apart from that, this molecule can be a possible target in the treatment of malignant neoplasias. The existence of the association between the expression of FOXP3 and the proliferation of tumor cells in the isolated PTC or associated with HT, is not known. This study has as its objective the evaluation of the presence of this protein in PTC being it associated or not to HT.

Materials and Methods

Selection of Biopsies

Between 2008 and 2011 two hundred and fifty (250) total thyroidectomies were held in the Surgery Sector at São Rafael Hospital, Salvador – BA, Brazil, for the diagnosis of PTC. Among them, thirty

(30) were randomly selected through a table of randomization that had been previously generated through the Random Allocation Software. Cases of PTC were selected with and without HT that showed a diagnosis that had been confirmed by two pathologists. One case with incomplete datum was excluded.

Histopathology and Immunohistochemical

The biopsies were fixed in paraffin. Immunohistochemical was done with the cutting of previously signed blades, antigenic recovery with EDTA PH9 and marking with antibody Anti FOXP3 [mAbcam 22510] Abcam® Cambridge, UK. The development was held with streptavidin for thirty (30) minutes in a phosphate buffered saline (PBS) solution with substrate and diaminobenzidine revealing chromogen (DAB). After the washing with distilled water, the material was counter stained with Harris's Hematoxylin. The blades were considered positive when they presented evident coloration on the PTC's cells that had been observed in four (04) areas of 400 xs. Each case was later classified as diffuse positive if more than fifty per cent (50%) of the cells presented coloration; focal positive if less than fifty per cent (50%) were stained and they were considered negative if no coloration in PTC was observed. The expression of FOXP3 in HT areas was also analyzed. All the blades were checked by two isolated pathologists and discordant cases were revised and classified in a common sense.

Results

The demographic data and the presence of positivity for FOXP3 in patients with PTC singly and with PTC and HT are shown on Table 1. Out of the twenty nine (29) patients with a diagnosis of PTC, twenty three (23) (79.3%) were women and six (06) (20.7%) were men. The average age was of forty two (42) years old. Eighteen (18) (62.1%) were diagnosed only with PTC and eleven (11) (37.9%) presented Hashimoto's thyroiditis simultaneously. The positive marking for FOXP3 in the Immunohistochemical was present in twenty-one (21) (72.4 %) of the analyzed cases. In order to

facilitate the comparison of PTC with and without association with HT, the analysis of the positive and negative reactions with FOXP3 was held singly for each one of these variables. There was not a statistically significant difference regarding age, sex, frequency of expression of FOXP3 and intensity of the expression of FOXP3 when one compared the group that presented isolated PTC, with the group that had PTC+HT. There was a predominance of positive diffuse marking in the group of HT+PTC and a balanced relation between the presentation of the focal and diffuse expression in the isolated PTC group.

The expression of FOXP3 in HT and PTC tissues is shown on Figure 1. We can observe an evident cytoplasmic coloration; with strong intensity for FOXP3 in PTC that is present in a diffuse or focal type, as well as the negativity in the normal thyroidal tissue. There is positive internal control for the Immunohistochemical reaction, as it can be observed in the positive T cells in the infiltrator lymphoid of TH.

Table 1

Demographic Variables and Expressions of FOXP3 in the Studied Sample

	PTC n=18	PTC + HT n=11	<i>pValue</i>
Age	38,6	47,4	
Sex	Female= 13 72%	Female= 10 91%	
Female: Male	Male= 5 28%	Male= 1 9%	
Frequency of Expression of FOXP3	Positive= 13 72% Negative= 5 28%	Positive= 8 73% Negative= 3 27%	<i>p = 0,97</i>
Frequency of Expression of FOXP3 regarding the sex	Female: 1 13 (85%) Male: 2 13 (15%)	Female: 7 11 (87, 5%) Male: 1 11 (12, 5%)	<i>p = 0,09</i>
Intensity of Expression of FOXP3	Diffuse: 7 54% Focal: 6 46%	Diffuse: 6 75% Focal: 2 25%	<i>p = 0,62</i>

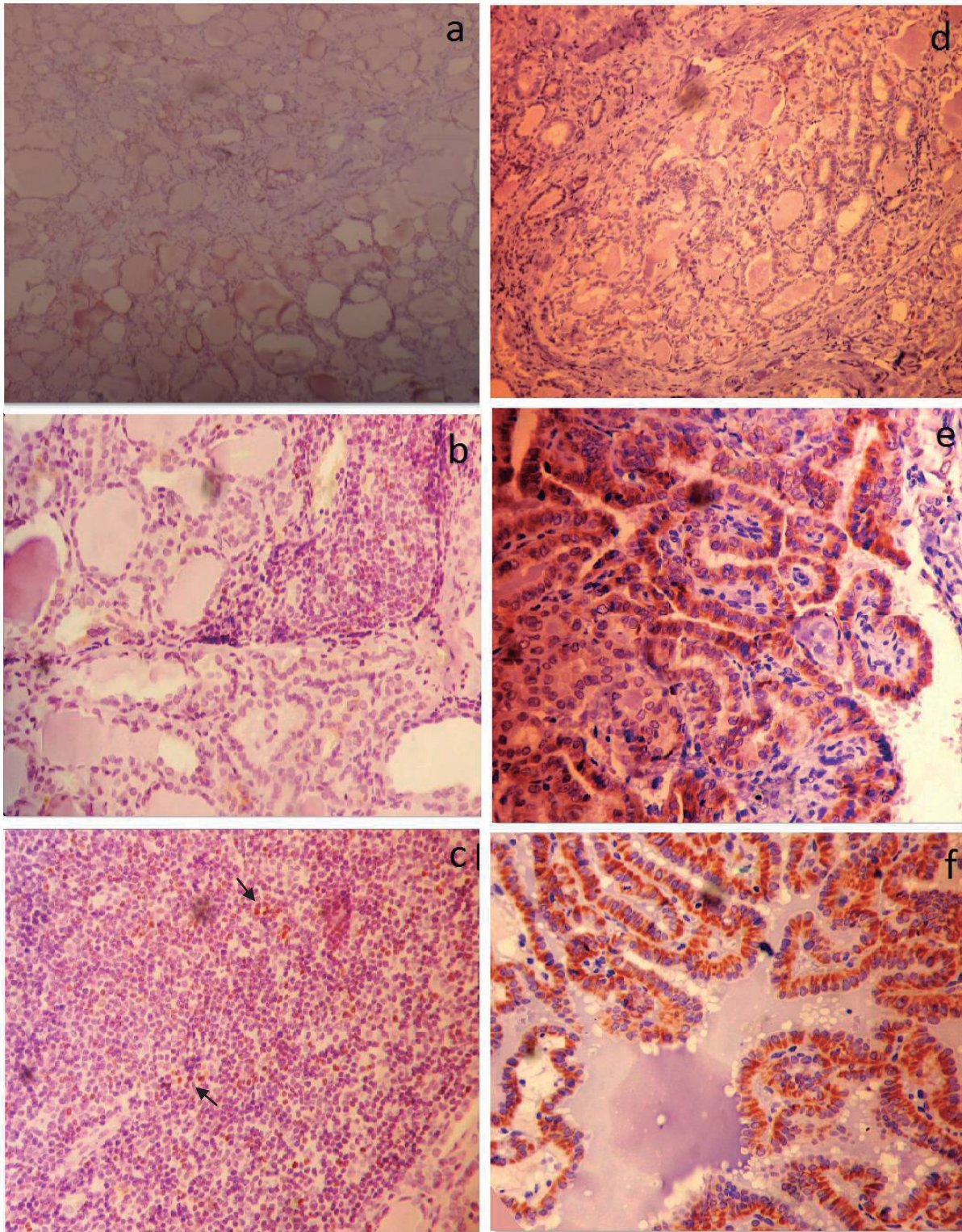


Figure 1. Immunohistochemical with marker of FOXP3: **a**, Without marking in thyroidal normal tissue; **b**, Absence of marking for FOXP3 in thyroid gland with no neoplasia and that presents lymphocyte infiltrated of Hashimoto's Thyroiditis (HT); **c**, Punctual markings of stained lymphocytes for FOXP3 in the lymphocyte infiltrated of Hashimoto's Thyroiditis that indicates the presence of regulatory T lymphocytes (Treg); **d**, Absence of marking for FOXP3 (400x) in an area of the thyroid without; **e**, Focal positive marking with less than 50% of stained neoplasia (400x); **f**, Diffuse positive marking with more than 50% of the stained cells (400x).

Discussion

The association between PTC and HT has been broadly documented in epidemiologic studies as well as in morphological ones (Cipolla *et al* 2005). FOXP3 is a marker of regulatory T cells and has also been detected in malignant tumors of many sites (Karanikas *et al* 2008). In the present study, we evaluated the expression of this molecule in thyroidean tissue of patients with PTC that presented or not associated HT. The diffuse or focal expression of FOXP3 was strongly associated to cancerous cells, since it had not been documented in areas with normal thyroidean tissue and only was detected in Treg lymphocytes in the areas of HT.

The relation between PTC and HT suggests an association that is not only accidental. In these cases the presence of a chronicle inflammatory process could induce the activation of genes that would lead to a malignant transformation (Cipolla *et al* 2005). Although FOXP3 is documented in malignant cells, this molecule is a marker of regulatory T cells (Hori *et al* 2003). The self-immune diseases as HT are associated to a fault in the mechanisms of regulation of the immune response, but, the possibility that during the chronicle inflammatory process, these cells could have been recruited for the inflammatory site, cannot be ignored. In this case, as a consequence, there could be a decrease of the defense against neoplastic cells and development of cancer. The relation of FOXP3 with cancer has been documented in cultures of cells of the breast carcinoma (Zhou *et al* 2009), prostate (Wang *et al* 2009), pancreas and melanoma (Karanikas *et al* 2008). The expression of FOXP3 has been shown in malignant pancreatic epithelial cells, as well as in lymphocytes, this way infiltrating the tumor (Hinz S *et al.*, 2007). While the nuclear expression of FOXP3 is observed in normal epithelial cells (Wang *et al*, 2009), the expression of FOXP3 is increased in the cytoplasm of malignant cells, and it can result in high index of mutation that is a characteristic of malignant transformation (Cunha LL *et al.*, 2012).

In HT there can be solid nodules that present moderate atypias called solid cell nests (SCNs) that can mimic PTC. SCNs can be of type 1 and 2. While the ones from type 2 are easily distinguished from PTC, the differentiation of SCNs from type 1 is more difficult, because the cells of SCNs present oval nucleus with clear chromatin, folders of chromatin, and are frequently rounded by eosinophilic basal membrane. The exam of immunohistochemical with P63 and HBME1 can be useful in the differentiation between PTC and SCNs. While SCNs are strongly positive for P63, only type 1 is positive for coloration by HBME1 (Seethla et al 2010).

In the present study, it was observed that the expression of FOXP3 in biopsies of thyroid that were highlighted through immunohistochemical can be a marker of PTC to be applied in doubtful uses of PTC. Specifically, the use of immunohistochemical for P63, HBME1 and FOXP3, could reach a higher specificity in the differentiation between the SCNs of thyroid and PTC. Our data indicate that FOXP3 is a good marker of PTC and that there is no difference of expression of FOXP3 in carcinoma, with and without HT.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

Neves MP conceived and designed the study and he was also responsible for data collection, data analysis and interpretation, the manuscript and final approval of the manuscript. Correia TC contributed for the data analysis and interpretation, histopathological analysis, and final approval of the manuscript. Mascarenhas MB and Correia TC contributed for the collection and assembly of data and final approval of the manuscript. Carvalho EM contributed for the conception and design of the study, data analysis and interpretation, manuscript, and final approval of the manuscript.

References

1. Saleh HA, Jin B, Barnwell J, Alzohaili O. Utility of immunohistochemical markers in differentiating benign from malignant follicular derived thyroid nodules. *Diagnostic Pathology* 26; 5:9, 2010.
2. Vierlinger K, Mansfeld MH, Koperek O et al. Identification of SERPINA1 as single marker for papillary thyroid carcinoma through microarray meta-analysis and quantification of its discriminatory power in independent validation. *BMC Medical Genomics* 6; 4:30, 2011.
3. Vriens MR, Moses W, Weng J, Peng M et al. Clinical and Molecular Features of Papillary Thyroid Cancer in Adolescents and Young Adults. *Cancer* 15; 117(2):259-67, 2011.
4. Eze OP, Starker LF, Carling T. The Role of Epigenetic Alterations in Papillary Thyroid Carcinogenesis. *Research Journal of Thyroid Research*, 895470, 2011.
5. Khanafshar E, Lloyd RV. The Spectrum of Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Advances in anatomic pathology*, 18:1, 2011.
6. Loyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head & Neck Pathology*, 5(1):51-6, 2011.
7. Benvenga S. Update on thyroid cancer. *Horm Metab Res*, v. 40, n. 5, p. 323-8, 2008.
8. Strauss M, Laurian N, Antebi E. Coexistent carcinoma of the thyroid gland and Hashimoto's thyroiditis. *Surgery Gynecology & Obstetrics*, v. 157, n. 3, p. 228-32, 1983.
9. Cipolla C. et al. Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid carcinoma. *Am Surg*, v. 71, p. 874-8, 2005.
10. Cotran RS, Kumar V, Abbas F. O sistema endócrino, In: Robbins, SL, Contran, R.S, Kumar V, Abbas F. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1011-47. 2005.

11. Rhoden KJ et al. RET/papillary thyroid cancer rearrangement in non-neoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2414-23, 2006.
12. Nikiforov YE. RET/PTC Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 6, p. 2040-2, 2006.
13. Ladoire S, Arnould L, Mignot G et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 125:65-72, 2010.
14. Merlo A et.al. FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v. 27, n.11, p.1746-1752, 2009.
15. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061, 2003.
16. Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Elkum N, Al-Tweigeri T, Dermime S. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy, *BMC Cancer*. Feb 23; 8:57, 2008.
17. Zhou X, Bucktrout SB, Jeker LT, Jeffrey A. Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺ T cells. *Curr Opin Immunol*. June; 21(3): 281–285, 2009.
18. Martin F, Ladoire S et al. Pathologic complete response to neo-adjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clinical Cancer Research* Apr 15;14(8):2413-20, 2008.
19. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, Barda AK, et.al. Foxp3 expression in human cancer cells. *Journal of Translational Medicine*, 6:19, 2008.
20. Schreiber TH. The Use of FoxP3 as a Biomarker and Prognostic Factor for Malignant Human

Tumor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* October 2007 16; 1931.

21. Salama P et al. Tumor-Infiltrating FOXP3⁺ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v.27, n.2, p.186-192, 2009.
22. Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012; 67 (5):483-8.
23. Seethala RR, Chiosea SI. Solid Cell Nests, Papillary Thyroid Micro carcinoma, and HBME1. *American Society for Clinical Pathology*, 134:167-170; 2010.
24. Wang L, Liu R, Li W et al. Somatic Single-hits Inactivate the X-linked Tumor Suppressor FOXP3 in the Prostate. *Cancer Cell*. 16(4): 336–346, 2009.
25. Martin F, Ladoire S, Mignot G et al. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*. v. 22: p. 4121-9, 2010.
26. Hinz S, Pagerls-Raluy L et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*. 2007 Sep 1; 67(17):8344-50.

Translated from Portuguese into English by Mrs. Denice Maria de Figueiredo Santos, certified translator registered by JUCEB under n ° 09/93 DOE 04-06-1993, resident of Rua Milton de Oliveira 73, Ed. Anacapri apt. 701, Barra, Salvador, Bahia, Brazil, Tel: (71) 3264-5635, on 11/29/2012. I swear the contents are true and faithful to the original text in Portuguese. Translation n ° 79/12.