



LUCAS LEITE CUNHA

**IMPACTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO PROGNÓSTICO DO PACIENTE
COM CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDE:
DA BANCADA À CLÍNICA**

CAMPINAS

2015

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUCAS LEITE CUNHA

IMPACTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO PROGNÓSTICO DO PACIENTE
COM CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDE:
DA BANCADA À CLÍNICA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências na Área de Concentração em Clínica Médica

ORIENTADOR: Prof^a Dr^a Laura Sterian Ward
CO-ORIENTADOR: Prof Dr José Vassallo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO LUCAS LEITE CUNHA, E ORIENTADO PELA
PROF^A. DR^A. LAURA STERIAN WARD.

CAMPINAS
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Juliana Ravaschio Franco de Camargo - CRB 8/6631

C914i Cunha, Lucas Leite, 1987-
Impacto da resposta imunológica no prognóstico do
paciente com carcinoma diferenciado de tireoide : da
bancada à clínica / Lucas Leite Cunha. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2015.

Orientador : Laura Sterian Ward.
Coorientador : José Vassallo.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Neoplasias -
Imunologia. 3. Prognóstico. 4. Linfócitos B. 5.
Estadiamento de neoplasias. I. Ward, Laura Sterian,
1956-. II. Vassallo, José, 1957-. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma:

Impact of immune response in the prognosis of patients with differentiated thyroid
carcinomas : from bench to bedside

Palavras-chave em inglês:

Thyroid Neoplasms

Neoplasms, Immunology

Prognosis

B-Lymphocytes

Neoplasm staging

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Maria Izabel Chiamolera

Janete Maria Cerutti

Ligia Vera Montali da Assumpção

Luis Alberto Magna

Data de defesa: 29-01-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUCAS LEITE CUNHA

ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). LAURA STERIAN WARD

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). LAURA STERIAN WARD



2. PROF(A). DR(A). MARIA IZABEL CHIAMOLERA



3. PROF(A). DR(A). JANETE MARIA CERUTTI



4. PROF(A). DR(A). LIGIA VERA MONTALI DA ASSUMPÇÃO



5. PROF(A). DR(A). LUIS ALBERTO MAGNA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29 de janeiro de 2015

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy. Although most of these patients experience clinical improvement with current therapeutic tools, 10-30% will develop recurrent disease and contribute to the 1,890 deaths that are estimated for 2014 in the United States. The cyclooxygenase (COX) are a group of enzymes that catalyze the formation of prostaglandins from arachidonic acid and COX2 activity has been implicated in carcinogenesis. Our group previously demonstrated that mixture of immune cells infiltrates tissue of thyroid cancers. The present study investigated the presence of immune cells markers and tumor markers of inflammatory profile, looking for prognostic markers in patients with differentiated thyroid carcinoma. We retrospectively investigated 437 patients with differentiated thyroid carcinoma, whose tissue samples previously fixed in formalin and included in paraffin blocks were kept in the Tissue Bank of the AC Camargo Cancer Center. Well-differentiated thyroid cancer was diagnosed in 305 patients: 252 with papillary carcinoma and 53 with follicular carcinoma. Clinical information was obtained from medical records. We obtained tissue of lymph node metastases at diagnosis of 25 patients. For these cases, we performed a paired analysis of metastatic tissue and primary tumor. Immunological cell markers were investigated in intratumoral areas, including tumor-associated macrophages (CD68) and subpopulations of tumor infiltrating lymphocytes, such as CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD45RO, GRANZYME B, CD69 and CD25. We also investigated the expression of COX2, IL-17A, IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-23 and CD134 in the tumor cells. Among all the immunological variables evaluated, only the enrichment of CD8+ lymphocytes and expression of COX2 were associated with recurrence. Multivariate analysis using the Cox model of proportional hazards adjusted for the presence of concurrent chronic lymphocytic thyroiditis, identified CD8+/COX2 as an independent marker for recurrence. Other immunohistochemical markers failed to predict the prognosis of patients. We notice an increase in the density of GRANZYME B + lymphocytes in

lymph node metastases when compared with their primary tumors. Lymph node metastases have lower expression of COX2 and IL-10. This suggests that tumor evasion mechanisms are impaired in metastatic tissues, explaining, at least in part, why the presence of lymph node metastases would not be an excellent prognostic marker in patients with differentiated thyroid cancer. Our study showed that the differentiated thyroid cancer is infiltrated by multiple immune cells and that the pattern of cellular infiltration appears to be associated with distinct clinical and pathological characteristics. This infiltrative mixed cell along with the production of inflammatory cytokines, creates a microenvironment profile that is important in determining the tumor aggressiveness. In fact, the presence of cytotoxic T lymphocytes and COX2 expression could predict the worst prognosis of the patients. Still, we found that lymph node metastasis is the place where there would be a more productive immune response and less evasive, favoring and effective immune response. It is fairly coherent with the little strength of lymph node metastasis as a prognostic predictor.

RESUMO

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna endócrina mais frequente. Muito embora a maioria destes pacientes apresente boa evolução clínica com as ferramentas terapêuticas atuais, 10-30% evoluirão com doença recorrente e contribuirão para as 1.890 mortes que são estimadas para 2014 nos Estados Unidos . As ciclooxigenases (COX) são um grupo de enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico e a atividade de COX2 tem sido implicada na carcinogênese. Nosso grupo demonstrou anteriormente que diferentes células do sistema imunológico infiltram tecidos de cânceres de tireoide. O presente trabalho investigou a presença de marcadores de células do sistema imunológico, bem como marcadores tumorais de perfil inflamatório, procurando marcadores de prognóstico em pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide. Foram investigados retrospectivamente 437 pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide, cujas amostras de tecido previamente fixadas em formalina e incluídas em blocos de parafina eram mantidas no Banco de Tecidos do A.C.Camargo Cancer Center. Câncer bem diferenciado de tireoide foi diagnosticado em 305 pacientes: 252 com carcinoma papilífero e 53 com carcinoma folicular. Informações clínicas foram obtidas dos prontuários. Obtivemos tecidos de metástases linfonodais ao diagnóstico de 25 pacientes. Para estes casos, fizemos análise pareada entre tecido metastático e tumor primário. Foram investigados marcadores de células imunológicas em áreas intratumorais, incluindo macrófagos associados a tumores (CD68) e subpopulações de linfócitos infiltrantes de tumor, como CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD45RO, GRANZIMA B, CD69 e CD25. Também foi investigada a expressão de COX2, IL-17A, IL-1 β , IL-10, IL-6, CD134 e IL-23 nas células tumorais. Entre todas as variáveis imunológicas avaliadas, apenas o enriquecimento de linfócitos CD8+ e expressão de COX2 foram associadas à recorrência. A análise multivariada, utilizando o modelo de riscos proporcionais de Cox ajustado para a presença de tireoidite crônica concomitante, identificou CD8+/COX2 como marcador independente de recidiva.

Outros marcadores imunoistoquímicos não conseguiram prever o prognóstico dos pacientes. Notamos um aumento da densidade de linfócitos GRANZIMA B+ nas metástases linfonodais se comparado com os respectivos tumores primários. Metástases linfonodais apresentam menor expressão de COX2 e de IL-10. Isto sugere que mecanismos de evasão tumoral estejam diminuídos nos tecidos metastáticos, explicando, pelo menos em parte, por que a presença de metástases linfonodais não seria um excelente marcador de prognóstico nos pacientes com câncer diferenciado de tireoide. Nosso estudo mostrou que o câncer diferenciado de tireoide é infiltrado por múltiplas células do sistema imunológico e que o padrão de infiltração celular parece se associar a características clínicas e anatomopatológicas distintas. Este misto celular infiltrativo, juntamente com a produção de citocinas inflamatórias, cria um perfil de microambiente que é importante na determinação da agressividade tumoral. De fato, a presença de linfócitos T citotóxicos e a expressão de COX2 puderam prever o pior prognóstico dos pacientes estudados. Ainda, observamos que a metástase linfonodal é o sítio onde ocorreria uma resposta imunológica mais efetora e menos evasiva, de forma a determinar de forma mais assertiva um ataque imunológico efetivo coerente com a pouca força da metástase linfonodal como um preditor de prognóstico.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
O câncer de tireoide	1
Princípios de imunologia tumoral	8
Imunologia tumoral do câncer diferenciado de tireoide	15
Justificativas	19
OBJETIVOS	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
Pacientes	23
Imunoistoquímica (IQ)	26
Avaliação da IQ	33
Análise de metástases linfonodais	34
Análise estatística	34
RESULTADOS	37
Células do sistema imune e variáveis clínicas e anatomopatológicas	38
Ativação de células do sistema imune e variáveis clínicas e anatomopatológicas	44
Perfil de expressão de marcadores inflamatórios pela neoplasia e variáveis clínicas e anatomopatológicas	47
Células do sistema imune, ativação do sistema imune e perfil inflamatório	52
Análise multivariada e análise de sobrevida	54
Estudo do microambiente inflamatório na metástase	73
A particularidade imunológica dos cânceres pediátricos	75
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	115

PÁGINA DE DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho à minha família, que sempre esteve ao meu lado:

- A todos os pacientes que foram diagnosticados com câncer. Eu trabalho por vocês.

- Aos meus pais que sempre me apoiaram em minha carreira. Sem eles, acredito que eu não teria conseguido;

- Aos meus destemidos avós, Maria Natividade Leite, Henrique Souza Leite (in memorian), Mario da Cunha (in memorian) e Nilsa da Cunha (in memorian). Tais como muitos brasileiros de nossa gente, sofreram penosa miséria no decurso de suas vidas. Esforço. Aridez. Muitos destes desafiaram a vida seca nordestina e migraram em busca de um futuro. Infelizmente, alguns não puderam nem estudar nem ver o fruto de seus empenhos. Por isso, a todos estes, esta honesta dedicatória.

PÁGINA DE AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por ter me sustentado até agora: sem Ele, nada haveria acontecido!

Aos meus admiráveis pais, Hélvio Honório da Cunha e Júlia Maria Leite Cunha, que sempre me apoiaram em minha carreira. À minha irmã, Juliana Leite Cunha Taleb, pelo apoio e incentivo. À pequena Valentinha e ao pequenino Davi, por me fazerem rir nos momentos mais inesperados. À minha querida tia, Jacirema Brunet Leite Rodrigues, por me ajudar em momentos difíceis. À minha avó, Maria Natividade Brunet Leite, por sempre interceder a Deus a meu favor. Às minhas inesquecíveis primas, Jacqueline e Isabelli (e respectivas famílias), que deixam minha família mais alegre. À querida tia Vilma Brunet por me ensinar a escrever: minha primeira mentora!

A minha orientadora, Professora Laura, por contribuir para ampliação da minha visão. Seu exemplo de vida, sua postura frente aos problemas, sua firmeza e seu empenho me inspiram no combate a uma sociedade melhor. Definitivamente, ela tem uma trajetória heróica.

A minha amiga Professora Elaine Morari, por me ouvir e por me ensinar muito, principalmente na disciplina da superação!

Ao ilustre Professor José Vassallo, que muito me ensinou e instruiu, sempre com muito bom humor de quem tem uma história heróica.

Ao Professor Anthony Hollemberg, que me mentoriou no estágio na Harvard Medical School e me ensinou muito sobre Ciências Básicas.

À Marjory Alana Marcello, pela amizade e revisão crítica desta tese.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular do Câncer e laboratórios vizinhos: Natassia, Raquel, Angélica, Jacqueline, Renata, Fernando, Ulieme, Viviane e Luiza. Agradeço pelos momentos juntos, pela paciência, ensinamentos, diversão, carinho e amizade. Muito obrigado! Um agradecimento especial à Marjory e Mariana.

Aos meus amigos e colegas Epemistas Luis Furlan, Herminio Neto, Mateus Franco, Scarlet D'Ávila, Marcos Pauferro, Luiza Domingues, Linus No, Matheus Simonato, Ana Ágata, Matheus Barros, Gabriel Barroso, Gabriel Glebocki, Ary Maciel, Fabrício Porto. Agradeço pelos momentos juntos e amizade.

Às Professoras Carmem Lima (FCM/Unicamp), Lucia Iochida (EPM/Unifesp) e Gisele Colleoni (EPM/Unifesp) por me ensinarem Ciência, Arte e Medicina.

Ao Professor Fernando Augusto Soares pela colaboração no projeto. À Suely Nonogaki, que me ajudou com a reação imunoistoquímica.

Este projeto contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a quem também gostaria de agradecer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Os principais tipos morfológicos de câncer de tireoide.	2
Figura 2. Teoria dos 3 Es	10
Figura 3. Diferentes papéis de COX2 na carcinogênese e progressão tumoral	12
Figura 4. Marcadores de células imunológicas	27
Figura 5: Marcadores de atividade das células imunológicas	29
Figura 6: Marcadores inflamatórios das células tumorais	30
Figura 7: Curvas de Kaplan-Meier mostrando diferentes padrões de prognóstico conforme as variáveis estudadas	67
Figura 8: Curva ROC mostrando incremento na acurácia da predição do prognóstico com o uso de variáveis imunológicas aliadas ao pTNM	69
Figura 9: Curva ROC mostrando incremento na acurácia da predição do prognóstico com o uso de variáveis imunológicas aliadas à classificação de risco proposta pela American Thyroid Association	72
Figura 10: Gráfico de pontos pareados mostrando aumento expressivo da densidade de linfócitos GRANZIMA B+ em metástases linfonodais de pacientes com câncer de tireoide	73
Figura 11: Gráfico de pontos pareados mostrando diminuição expressiva de COX2 em tecidos metastáticos	74
Figura 12: Gráfico de pontos pareados mostrando diminuição da expressão de IL-10 em tecidos de linfonodos metastáticos	74
Figura 13: Curvas de Kaplan-Meier comparando sobrevida livre de recidiva em pacientes pediátricos versus não pediátricos	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Categorias de risco de recorrência conforme a American Thyroid Association	5
Tabela 2. Análise descritiva resumindo todos os pacientes estudados	24
Tabela 3. Especificações dos marcadores imunoistoquímicos	32
Tabela 4. Distribuição das diferentes categorias dos marcadores de células do sistema imunológico em todos os tecidos analisados	38
Tabela 5: Resumo das associações entre variáveis clínicas e anatomopatológicas e infiltração de células do sistema imunológico	40
Tabela 6: Distribuição das diferentes categorias dos marcadores de atividade das células do sistema imunológico em todos os tecidos analisados	44
Tabela 7: Resumo das associações significativas entre infiltração de linfócitos ativados e características clínicas e anatomopatológicas	46
Tabela 8: Distribuição das diferentes categorias dos marcadores inflamatórios expressos pelas células foliculares normais ou tumorais	47
Tabela 9: Resumo das associações significativas entre perfil de expressão de marcadores inflamatórios e características clínicas e anatomopatológicas	51
Tabela 10: Correlação entre os múltiplos marcadores moleculares estudados	53
Tabela 11: Associações obtidas pela análise de regressão logística múltipla	56
Tabela 12: Associações obtidas pela análise de regressão linear múltipla	58
Tabela 13: Resumo das associações obtidas pela análise multivariada	59
Tabela 14: Análise univariada comparando a sobrevida livre de doença entre pacientes com diferentes características clínicas e anatomopatológicas	61
Tabela 15: Análise univariada comparando a sobrevida livre de recidiva entre pacientes cujos tumores apresentaram diferentes perfis de infiltração linfocitária	62

Tabela 16: Análise univariada comparando a sobrevida livre de recidiva entre pacientes cujos tumores apresentaram infiltrado inflamatório ativado ou não e com diferentes perfis de microambiente tumoral	63
Tabela 17: Variável imunológica obtida a partir da infiltração de linfócitos T citotóxicos e expressão tumoral de COX2	64
Tabela 18: Modelo de Cox para análise multivariada de sobrevida	66
Tabela 19: Valores de HR e respectivos scores de cada categoria	68
Tabela 20: Comparação entre os preditores de prognóstico. Usamos a área sob a curva como estimador da acurácia	68
Tabela 21: Análise multivariada comparando o parâmetro imunológico com tiroidite concomitante e a estratificação de risco propsta pela American Thyroid Association	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AKAP9	do inglês, A-kinase anchor protein 9
AKT	do inglês, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
BRAF	do inglês, B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CD3	do inglês, cluster of differentiation 3
CD4	do inglês, cluster of differentiation 4
CD8	do inglês, cluster of differentiation 8
CD16	do inglês, cluster of differentiation 16
CD20	do inglês, cluster of differentiation 20
CD25	do inglês, cluster of differentiation 25
CD45RO	do inglês, cluster of differentiation 45RO
CD68	do inglês, cluster of differentiation 68
CD69	do inglês, cluster of differentiation 69
CD134	do inglês, cluster of differentiation 134
COX2	Ciclo-oxigenase 2
DAB	3,3 - tetrahydrocloroeto-diaminobenzidina
EUA	Estados Unidos da América
FoxP3	do inglês, forkhead box P3
HR	do inglês, Hazard ratio
IQ	Imunoistoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1 β	Interleucina 1 beta

IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-23	Interleucina 23
MAPK	do inglês, mitogen activated kinase-like protein
MDSC	do inglês, myeloid-derived supressor cells (Célula supressora derivada da linhagem mielóide)
MHC	do inglês, Major Histocompatibility Complex
NK	do inglês, linfócitos Natural Killers
NTRK1	do inglês, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
PCI	Pesquisa de Corpo Inteiro
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	do inglês, phosphoinositide-3-kinase
PIK3CA	do inglês, phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha, polypeptide
RAS	do inglês, rat sarcoma viral oncogene homolog
RET	do inglês, Rearranged during transfection
RET/PTC	Rearranjo entre os genes do inglês, Rearranged during transfection /papillary thyroid carcinoma
ROR- γ T	do inglês, RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptor C
Tg	Tireoglobulina
TGF- β	do inglês, Transforming growth factor-beta
Th0	Linfócito T auxiliar 0
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
Th17	Linfócito T auxiliar 17
TLC	Tiroidite linfocítica crônica

TMA	do inglês, Tissue Microarray
TNM	do inglês, Tumor Node Metastasis
<i>TP53</i>	do inglês, tumor protein p53
TSH	do inglês, Thyroid-stimulating Hormone (hormônio estimulador da tireoide)

INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna endócrina mais frequente e representa 2% de todos os cânceres humanos (1). Muito embora a maioria destes pacientes apresente boa evolução clínica com as ferramentas terapêuticas atuais, 10 a 30% evoluirão com doença recorrente, pararão de responder à radioiodo terapia, apresentarão disseminação metastática e contribuirão para as 1.890 mortes que são estimadas para 2014 nos Estados Unidos (2). A incidência do câncer diferenciado de tireoide, nos Estados Unidos e no mundo continua a aumentar, tendo mais do que dobrado nas últimas três décadas (3-5). Dados recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA – Brasil) projetam esse tumor como o quinto mais frequente entre mulheres no ano de 2014. Esperam-se 9.200 casos novos de câncer da tireoide em 2014, com um risco estimado de 7,91 casos a cada 100 mil mulheres (6). Os tipos morfológicos mais comuns de câncer de tireoide estão expostos na figura 1 e são os carcinomas papilíferos (50-80%), carcinomas foliculares (10-40%), carcinomas medulares (5-15%), carcinomas pouco diferenciados (2-3%) e o carcinoma anaplásico (cerca de 1%) (6).

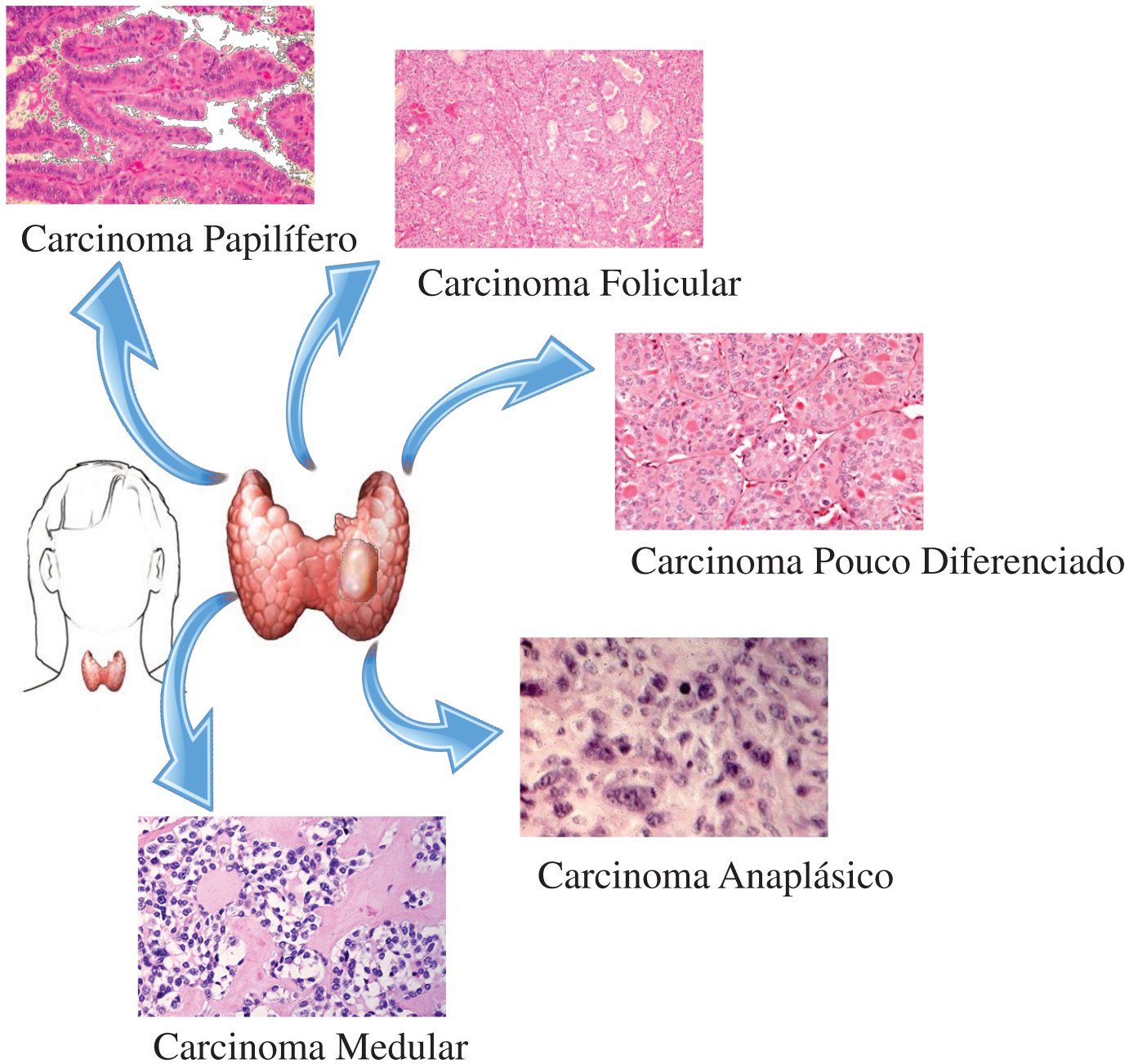


Figura 1: Os principais tipos morfológicos de câncer de tireoide. Os cânceres derivados de células foliculares (produtoras de hormônios tiroideanos como triiodotironina e tiroxina) podem ser classificados em carcinomas papilíferos, carcinomas foliculares, carcinomas pouco diferenciados e carcinomas anaplásicos. Já as células C (produtoras de calcitonina) são a origem do carcinoma medular.

A radiação ionizante é o fator de risco para câncer diferenciado de tireoide mais consolidado e estudado. A tireoide pode ser mais irradiada que os demais tecidos, considerando sua posição anatômica e sua capacidade de concentrar iodo (7). Mahoney e colaboradores mostraram que a incidência de câncer de tireoide tem aumentado depois do acidente de Chernobyl em todas as regiões da República de Belarus e entre todas as faixas etárias, muito embora as crianças tenham experimentado um aumento mais pronunciado (8). Em 2011, Schonfeld e colaboradores apresentaram uma revisão do uso de radiação para finalidade médica e sua significância no câncer de tireoide, especialmente entre crianças, que parecem ser mais suscetíveis aos efeitos radiação ionizante (9). Os autores concluíram que o raio-X pouco afeta a incidência do câncer de tireoide, mas este é o principal câncer secundário pós-tratamento de linfoma de Hodgkin da infância e seus efeitos podem ser vistos mesmo 40 anos após a aplicação da radioterapia (10). Vários estudos têm mostrado associação entre o câncer de tireoide e a exposição ao ^{131}I , que poderia causar diversas alterações moleculares em genes como *RET*, *NTRK1*, *RAS*, and *BRAF* (11-13). Um possível fator de risco ambiental é a ingestão de iodo (14). De fato, o aumento do carcinoma papilífero tem sido relacionado epidemiologicamente a uma dieta rica em iodo (15).

O câncer de tireoide ocorre com maior frequência em mulheres do que em homens por razões não completamente elucidadas (aproximadamente 3 mulheres para cada 1 homem). O carcinoma papilífero geralmente é diagnosticado durante a faixa etária reprodutiva (30-49 anos), em uma razão de 3-5 mulheres para cada homem, tendo pico de incidência em mulheres em fase de pós-menopausa (16, 17). Muito embora seja mais frequente em mulheres, uma maior taxa de malignidade pode ser observada em nódulos de homens (18) e vários estudos sugerem que homens com câncer de tireoide têm pior prognóstico se comparado a mulheres (16, 19, 20). Oyer

e colaboradores estudaram uma coorte de 36.725 pacientes e concluíram que homens com carcinoma papilífero ou folicular tendem a ser diagnosticados com idade e estágios mais avançados de doença. Entretanto, quando comparados de acordo com cada estágio de doença, não houve diferenças de sobrevidas significantes (21).

A American Joint Committee on Cancer (AJCC) e a International Union against Cancer (UICC) estabeleceram um sistema de classificação rotineiramente usado no estadiamento dos pacientes com câncer diferenciado de tireoide (20, 22, 23). Este sistema utiliza a idade do paciente ao diagnóstico como critério principal além do clássico pTNM (do inglês, Tumor Node Metastasis). Esta classificação também é útil para registros hospitalares e padronização de estudos epidemiológicos. Vários outros sistemas de classificação surgiram numa tentativa de melhorar a acurácia da predição do prognóstico destes pacientes, como os sistemas CAEORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), AGES (Age, Grade, Extent of disease, Size), AMES (Age, Metastasis, Extent of disease, Size), MACIS (Metastasis, Age at presentation, Completeness of surgical resection, Invasion (extrathyroidal), Size), OSU (Ohio State University), MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center), and NTCTCS (National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study) (24-31). Estes sistemas levam em consideração fatores de prognóstico identificados em análises multivariadas de estudos retrospectivos, sendo os fatores mais eficientes aqueles relacionados à idade do paciente ao diagnóstico, à presença de metástases ao diagnóstico e à extensão tumoral. Cada um destes sistemas permite uma identificação acurada da maioria dos pacientes que possuem baixo risco de mortalidade, propiciando que estes pacientes sejam submetidos a uma terapêutica menos agressiva que pacientes identificados como possuindo alto risco de mortalidade, que se beneficiam de uma estratégia terapêutica mais contundente. Apesar de todas estas classificações, algumas incertezas

permanecem, tais como a predição do prognóstico a curto prazo e da probabilidade de permanecer livre de doença (32). A American Thyroid Association propôs uma classificação de risco de recorrência em três categorias: baixo risco, risco intermediário e alto risco de recorrência (32) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação de risco de recorrência proposta pela American Thyroid Association (32).

Classificação de risco de recorrência	Critérios
Baixo risco	1. Ausência de metástases locorregionais ou à distância 2. Ressecção tumoral macroscopicamente completa 3. Ausência de tipo histológico agressivo (exemplo: carcinoma de células altas, insular, células colunares) 4. Ausência de invasão vascular 5. Ausência de captação de iodo radioativo fora do leito cervical na PCI pós-dose terapêutica de ^{131}I
Risco intermediário	1. Invasão tumoral microscópica no tecido conjuntivo peritiroideano no momento da cirurgia 2. Metástase em linfonodos cervicais 3. Captação de iodo radioativo fora do leito cervical após ablação de restos tiroideanos 4. Tipo histológico agressivo ou invasão vascular
Alto risco	1. Invasão tumoral macroscópica 2. Ressecção tumoral incompleta 3. Metástase à distância 4. Tireoglobulinemia desproporcional ao visto na PCI pós-dose terapêutica de ^{131}I

A taxa de mortalidade por câncer em geral tem diminuído ao longo dos últimos anos (2). Entretanto, dados comparativos de 2001 a 2010 mostram que a taxa de mortalidade por câncer de tireoide aumentou mais recentemente, passando de 0,47 para 0,50 por 100 mil mulheres e de 0,48 para 0,51 por 100 mil homens (2). Este dado sugere que novos avanços na abordagem clínica destes pacientes são necessários. Neste contexto, a medicina translacional emerge como uma importante ferramenta para o melhor entendimento da dinâmica molecular destes tumores, podendo ajudar na construção de uma clínica mais específica e um tratamento mais individualizado.

A via da MAPK desempenha um papel importante na patogênese molecular do câncer de tireoide. Três genes desta via (*BRAF*, *RET/PTC* e *RAS*) são frequentes alvos de eventos genéticos mutuamente exclusivos implicados na progressão do carcinoma papilífero (33). A mutação de *BRAF* é a alteração genética mais frequente e pode ser encontrada em aproximadamente 45% dos casos de carcinomas papilíferos (12). A mutação de *BRAF* mais frequente resulta na substituição de uma valina por um ácido glutâmico na posição 600 (V600E) da proteína, muito embora também tenham sido descritos transverso A>G na posição 1801 do gene (K601E), fusão com o gene *AKAP9* (A-kinase anchor protein 9), além de inserções e deleções pequenas ao redor do códon 600 (34-36). Todas estas mutações aumentam a atividade da proteína BRAF, causando progressão do tumor e induzindo características de agressividade (37, 38). Como consequência, estas alterações genéticas levam a uma diminuição da expressão de genes específicos da célula folicular tiroideana, diminuição da captação de radioiodo e pronunciado hipotireoidismo (38, 39). A translocação RET/PTC está presente em carcinomas papilíferos esporádicos, mas é mais frequentemente encontrada em carcinomas papilíferos pós-irradiação (40-42). Mesmo que a associação com prognóstico não seja forte, esta translocação é um importante alvo para

inibidores moleculares seletivos (33, 43-45). A mutação de *RAS* não está restrita a um tipo morfológico específico, sendo encontrada em adenomas foliculares, carcinomas foliculares, variante folicular do carcinoma papilífero e, em alta frequência, em carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos (46, 47). Em células epiteliais, *RAS* pode ser ativado tanto pela via MAPK quanto pela via PI3K/AKT (33). Mutações em *PIK3CA* têm sido descritas em 12-23% dos casos de carcinomas anaplásicos (48), podendo estar presente em adenomas foliculares, carcinomas foliculares e carcinomas papilíferos (48-50). Alterações neste gene podem ativar a cascata PI3K por meio do aumento da atividade de AKT, levando à progressão tumoral e dediferenciação (39). Outro gene frequentemente mutado em cânceres de tireoide é *TP53*. Mutações em *TP53* são mais frequentes em carcinomas anaplásicos se comparados a carcinomas diferenciados (51-53), contribuindo para a hipótese de que a mutação neste gene seja um evento tardio na progressão do câncer de tireoide. De fato, estudos com cultura celular mostraram que esta mutação contribui para o fenótipo dediferenciado com diminuição importante de fatores de transcrição específicos da célula folicular tireoideana (52, 54).

Princípios de imunologia tumoral

Uma estreita relação entre resposta imunológica e câncer foi primeiramente proposta por Virchow em 1893. Coley demonstrou que produtos bacterianos seriam capazes de ajudar pacientes com tumores inoperáveis. De fato, a aplicação do *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) e outras substâncias imunoestimulatórias mostraram benefícios clínicos que levaram à aprovação do uso destes componentes em pacientes com tumores sólidos como câncer de bexiga (55). A capacidade do sistema imunológico em interferir com a progressão tumoral tem sido amplamente evidenciada por estudos clínicos e epidemiológicos. Assim, o sucesso da Herceptina em pacientes com câncer de mama e do Ipilimumab em pacientes com melanoma metastático tem encorajado muitos cientistas pelo mundo a se dedicarem à imunologia tumoral.

A presença de linfócitos em áreas periféricas ou intra-tumorais é uma evidência de que o sistema imunológico pode responder à transformação maligna. Diversos estudos mostraram que altas densidades de linfócitos T CD8+ (linfócitos T citotóxicos) estão correlacionadas ao prognóstico de pacientes com câncer (56), de forma que a presença de linfócitos infiltrantes de tumor foi capaz de prever o melhor prognóstico de maneira independente em vários tipos de câncer, incluindo melanoma maligno (57), ovário (58), mama (59), carcinoma oral de células escamosas (60), esôfago (61) e cólon (62). A compreensão de como células do sistema imunológico e células tumorais poderiam interagir advém de diferentes teorias, explicadas abaixo.

Modelos de transplante de tumores forneceram suporte experimental para a ideia de que células tumorais poderiam ser reprimidas pelo sistema imunológico. Estes achados sugeriram fortemente que haveria antígenos tumorais que formariam a base da teoria da imunovigilância, postulada por Burnet e Thomas (63, 64). Embora existam fortes evidências de que a teoria da

imunovigilância tumoral seja capaz de restringir o crescimento de tumores iniciados por vírus, poucas evidências apoiam a ideia de que esta seja capaz de refrear o crescimento tumoral induzido por agentes químicos (56, 65), sugerindo que um novo modelo mais robusto seja necessário para melhor explicar a relação entre sistema imunológico e tumores.

Durante a transformação tumoral, células malignas podem expressar antígenos associados a tumores e antígenos específicos de tumores. Antígenos associados a tumores são macromoléculas frequentemente encontradas em células tumorais, enquanto que antígenos específicos de tumores são macromoléculas unicamente expressas em células tumorais (66). Muito embora estes antígenos possam servir de alvos imunoterápicos, a aplicação destes é mais frequente no diagnóstico de malignidade e no acompanhamento clínico dos pacientes (67).

Em 2002, Dunn e Schrieber propuseram a hipótese da imunoeedição. De acordo com esta hipótese, a imunoeedição seria responsável tanto por eliminar tumores quanto por esculpir fenótipos imunogênicos que, eventualmente, se formam em hospedeiros imunocompetentes (68). Esta hipótese, também conhecida como teoria dos 3 Es, sugere que tumores e sistema imunológico interajam em 3 fases (figura 2). Células tumorais, inicialmente, seriam eliminadas pelo sistema imunológico antes mesmo de se tornarem clinicamente detectáveis e isto seria equivalente à fase da imunovigilância. A Eliminação é seguida pela fase de Equilíbrio, no qual o processo de eliminação de variantes menos imunogênicas toma conta até o estabelecimento da fase de Evasão (ou Escape) da imunovigilância (68). Geralmente, no momento em que os tumores podem ser clinicamente detectados, eles já se apresentam em franca Evasão tumoral, podendo inclusive se valer de mecanismos imunológicos para promover o crescimento e progressão tumoral (69). Este cenário molecular se configura como o principal obstáculo para o sucesso da imunoterapia atualmente.

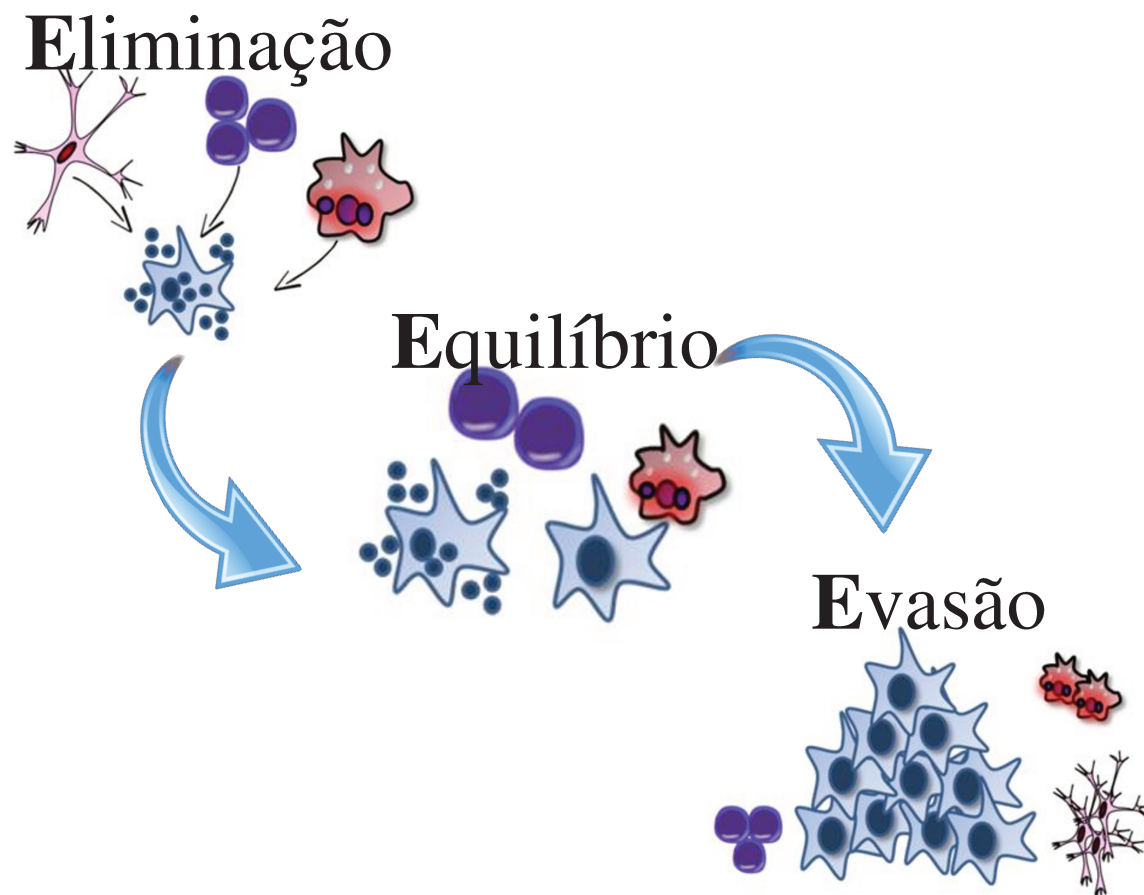


Figura 2: Teoria dos 3Es. Segundo esta teoria a interação entre sistema imunológico e tumores se daria em 3 fases distintas. Na primeira fase (Eliminação), células tumorais seriam reconhecidas e eliminadas pela resposta imunológica, numa fase chamada de imunovigilância. Na segunda fase (Equilíbrio), as células tumorais e células imunológicas passariam a coexistir em um equilíbrio dinâmico até que a terceira fase (Evasão) entrasse em cena. Nesta fase as células tumorais selecionadas não seriam mais alvos da resposta imunológica, mas, ao contrário, seriam capazes de estimular mecanismos imunológicos facilitadores da progressão tumoral.

Poschke e colaboradores classificaram o processo de evasão tumoral em dois distintos mecanismos: camuflagem e sabotagem. A camuflagem ocorre no nível do microambiente tumoral. Pode ser descrita como anormalidades na expressão de antígenos ligados ao complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe I que capacitam tumores a adquirirem um

fenótipo mais inerte ao sistema imunológico de forma que as células tumorais não são detectadas pelas células do sistema imunológico (70). Já a sabotagem pode ser definida como a capacidade de alguns tumores em manipular o sistema imunológico do próprio hospedeiro de forma que este passe a proteger as células tumorais do ataque imunológico. Tumores fazem isso recrutando ou facilitando a diferenciação de células supressoras da linhagem mielóide (MDSCs, do inglês, Myeloid Derived Suppressor Cells) e linfócitos T regulatórios (Treg). Em condições fisiológicas, estas duas células contribuem para a resolução imunológica que impede um processo inflamatório exacerbado (70). A infiltração destas células, juntamente com a produção tumoral de macromoléculas inflamatórias (COX2, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-23 e etc), promovem um microambiente dito permissivo para a progressão tumoral.

Uma atenção especial deve ser dada à enzima Ciclo-oxigenase 2 (COX2). Ciclo-oxigenases são enzimas que compõem a cascata de síntese de derivados do ácido aracdônico, catalizando a formação de prostaglandinas. Existem duas principais ciclo-oxigenases: COX1 e COX2 (71). Particularmente, COX2 é uma enzima induzível (72) recentemente encontrada como expressa em tumores humanos (73-76). Isso sugere que COX2 desempenhe um papel importante na carcinogênese ou progressão tumoral (figura 3). Alguns resultados sugerem que COX2 pode induzir angiogênese, além de facilitar a proliferação e transformação celulares (77, 78). Ainda, COX2 favorece o padrão de resposta imunológica Th2, que apresentaria um papel protumorigênico acentuado (79). Em um modelo de carcinogênese tiroideana induzida por agentes químicos, Ota e colaboradores demonstraram que COX2 tem um papel importante na proliferação celular, muito embora não tenha papel pronunciado na indução tumoral (80). Não há estudos mostrando COX2 como um marcador de prognóstico em pacientes com câncer de tireoide.

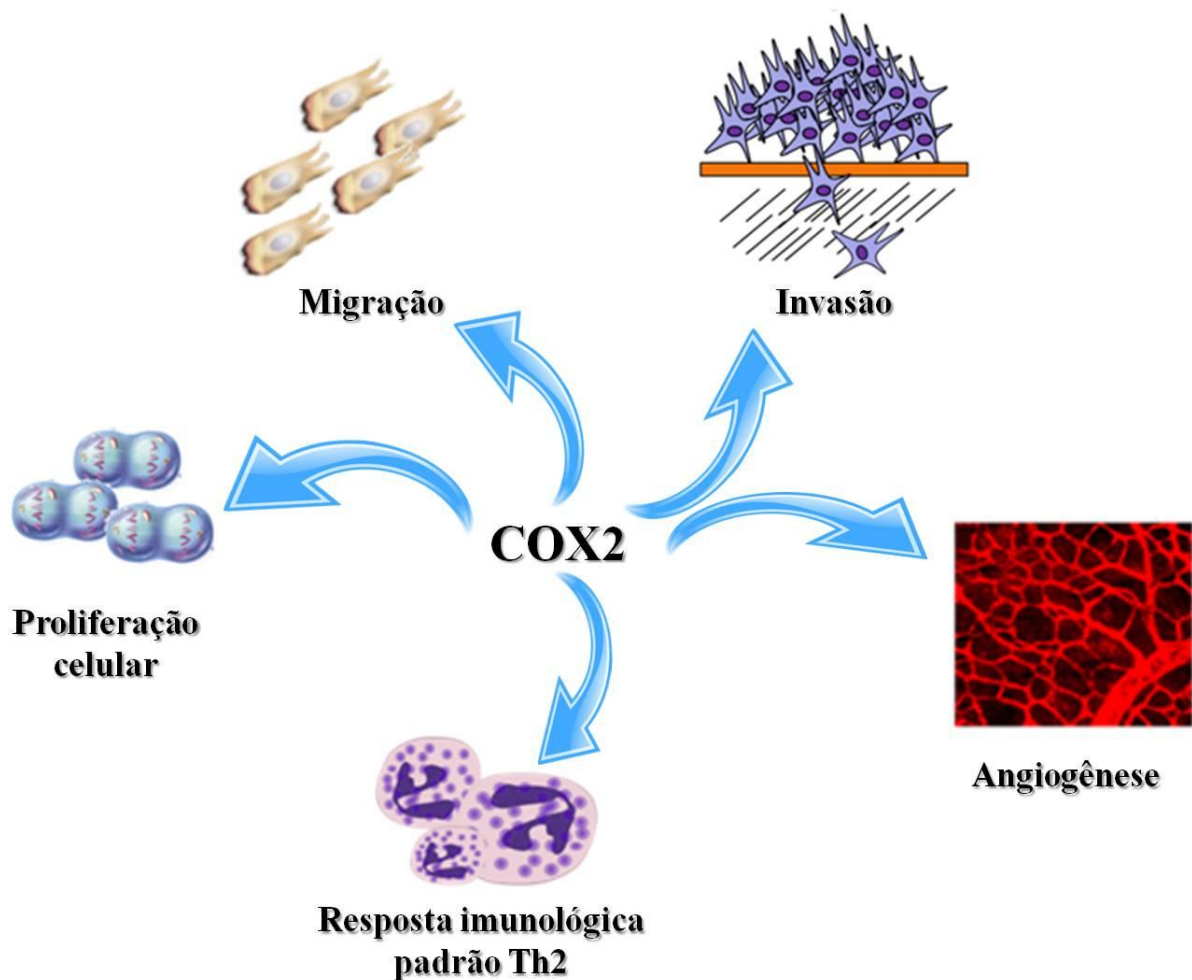


Figura 3: COX2 é uma enzima envolvida na produção de prostaglandinas. Estudos mostram que esta enzima também estaria envolvida na proliferação celular, migração celular, invasão tumoral, angiogênese e no estabelecimento de uma resposta imunológica padrão Th2 (predominantemente humoral e pró-tumorigênico).

Outro importante mecanismo de escape tumoral é a disfunção de linfócitos T. Linfócitos T são achados frequentes entre os linfócitos infiltrantes de tumores. A maioria destes linfócitos são linfócitos naive, incapazes funcionalmente de reconhecer células tumorais (81). Uma pequena parcela exibe sinais de ativação linfocitária, mas são linfócitos anérgicos ou tolerantes

aos tumores (81). A tolerância de linfócitos T induzida por tumores pode ser direcionada a antígenos próprios ou não próprios (82-84). Lee e colaboradores estudaram linfócitos T citotóxicos circulantes em pacientes com melanoma. Estes autores observaram que alguns destes linfócitos T citotóxicos apresentaram marcadores de células efectoras e de células naïve. Mesmo apresentando marcadores de células efectoras, estas células eram funcionalmente irresponsivas, incapazes de lisar células de melanoma ou produzir citocinas em resposta a mitógenos, sugerindo que esta população celular tenha se tornado anérgica in vivo. Quando estimuladas com antígenos associados a tumores, estes linfócitos T citotóxicos não expressaram CD69, que é um marcador precoce de ativação linfocitária (85).

Mortarini e colaboradores observaram que linfonodos comprometidos com células de melanoma eram enriquecidos com linfócitos. Entretanto, na maioria dos casos, os linfócitos T citotóxicos dirigidos a antígenos tumorais apresentaram fenótipos imaturos e somente 7 de 23 pacientes apresentaram linfócitos com fenótipos pré-terminais. Em uma pequena parcela dos casos, os autores detectaram linfócitos que expressavam GRANZIMA B citoplasmática e, nestes casos, estes linfócitos ativados apenas margeavam as células tumorais sem conseguir adentrar o centro da lesão. Ainda, os autores não encontraram sinais morfológicos de regressão tumoral (necrose ou apoptose), sugerindo que a incompleta maturação de linfócitos T citotóxicos aliada à pouca capacidade de ativação poderia prejudicar a destruição celular em linfonodos comprometidos (86).

Em uma meta-análise, Gooden et al demonstraram que a infiltração tanto de linfócitos CD3+ (marcador pan-T) quanto de linfócitos T citotóxicos influenciam positivamente a sobrevida de pacientes com tumores sólidos (87). Entretanto, muitas são as variáveis que poderiam influenciar o papel biológico destes linfócitos, tornando difícil a compreensão do exato

mecanismo de proteção imunológica através da simples associação entre a presença de linfócitos infiltrantes de tumores e prognóstico. Alguns estudos tentam obter uma perspectiva funcional por meio da investigação de marcadores imunoistoquímicos de ativação linfocitária, como GRANZIMA B (88), CD25 (89) e CD69 (90). Não há estudos mostrando a atividade linfocitária em carcinomas diferenciados de tireoide.

Imunologia tumoral do câncer diferenciado de tireoide

O câncer diferenciado de tireoide é um ótimo modelo de estudo para imunologia tumoral, pois frequentemente se mostra associado a sinais de resposta imunológica, como presença de tiroidite linfocítica crônica (TLC) concomitante ao tumor (91). Ainda, linfócitos infiltrantes de tumor e macrófagos associados ao tumor também são achados comuns em câncer de tireoide (92-96).

Várias observações sugerem que o sistema imunológico pode exercer importante papel no prognóstico destes pacientes (97). Nosso grupo demonstrou que a probabilidade de pacientes com câncer diferenciado de tireoide e com história de autoimunidade tireoidiana prévia ou autoanticorpos antitireoidianos ter um pior prognóstico é significativamente menor do que pacientes sem evidência de autoimunidade prévia, sugerindo que a atividade autoimune contra a glândula tireoide pode exercer um papel de proteção em pacientes com câncer diferenciado de tireoide (98). A associação entre TLC/linfócitos/macrófagos e câncer diferenciado de tireoide permanece controversa e a presença de TLC nos câncer diferenciado de tireoide é reportada em uma ampla frequência, variando de 0,5% a 38% (91, 99-102). Alguns investigadores mostram que a presença de TLC ou ainda linfócitos infiltrantes de tumores quando associada ao câncer diferenciado de tireoide imprime a esses pacientes um melhor prognóstico e menor agressividade da doença no momento de sua apresentação (96, 103-105). No entanto, outros investigadores não encontraram tal associação, sugerindo que a destruição autoimune das células tumorais não é capaz de alterar o prognóstico destes pacientes de modo efetivo (106-108) ou mesmo desfavoreça o prognóstico destes pacientes (109).

Nosso grupo recentemente estudou o perfil de infiltração de células do sistema imunológico de pacientes com câncer diferenciado de tireoide e de pacientes com lesões benignas

da tireoide (110, 111). A infiltração de macrófagos foi mais freqüente entre as mulheres e foi associada à melhor sobrevida livre de recidiva. A infiltração de linfócitos T citotóxicos se mostrou um possível marcador de melhor prognóstico. Entretanto, a análise multivariada falhou em mostrar estas duas células como marcador independente do prognóstico destes pacientes (110).

Matsubayashi e colaboradores estudaram 95 pacientes com carcinoma papilífero que foram tratados cirurgicamente em 1983 e foram seguidos clinicamente até 1992. O grupo observou que 36 pacientes apresentaram linfócitos infiltrantes de tumores nos tecidos de carcinomas papilíferos, enquanto que 59 pacientes não apresentavam evidências de linfócitos infiltrantes de tumores. A recorrência do tumor foi observada em apenas um dos pacientes (2,8%) cujos tumores apresentavam linfócitos, enquanto que 11 pacientes (18,6%) cujos tumores não apresentavam linfócitos apresentaram recorrência, sugerindo que a presença de linfócitos infiltrantes de tumores pudesse ser um mecanismo protetor no prognóstico destes pacientes (95). Villagelin e colaboradores investigaram 157 pacientes consecutivos com carcinoma papilífero de tireoide. Estes pacientes foram classificados em três grupos: (A) aqueles que apresentavam linfócitos infiltrantes de tumores; (B) aqueles que apresentavam linfócitos apenas margeando o tumor; (C) aqueles que não apresentavam linfócitos. Após uma mediana de 8 anos de seguimento clínico, o grupo C apresentou uma taxa de recorrência significativamente maior que os grupos A e B, sugerindo que a presença de linfócitos infiltrantes de tumores possam favorecer o prognóstico dos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide (112).

Já French e colaboradores não obtiveram o mesmo resultado. Este grupo estudou 100 pacientes com carcinomas papilíferos e demonstrou que pacientes cujos tumores apresentavam linfócitos infiltrando áreas tumorais apresentavam estadiamento mais avançado ao diagnóstico,

maior frequência de invasão extra-tiroideana e metástases linfonodais, quando comparados àqueles cujos tumores não apresentavam linfócitos (109). Entretanto, linfócitos são um conjunto de muitas células que desempenham funções completamente diferentes a depender do fenótipo de cada grupo celular.

A composição de linfócitos infiltrantes de tumores foi estudada por Modi e colaboradores que mostraram que 43% de 21 casos de carcinoma papilífero apresentavam linfócitos T auxiliares, 38% apresentavam linfócitos T citotóxicos, 48% apresentavam linfócitos B e somente 1 caso (5%) continha linfócitos NK (113). Gupta e col. mostraram que a proliferação de linfócitos infiltrantes de tumores foi associada ao aumento do tempo livre de doença em crianças e adultos jovens com câncer de tireoide (96). Porém o baixo número de amostras e curto tempo de seguimento limitam as conclusões destes estudos. French e colaboradores mostraram que a infiltração de linfócitos Treg estava correlacionada à presença de metástases linfonodais e que a infiltração de linfócitos T CD4+ (auxiliares) estava positivamente correlacionada ao maior tamanho tumoral (109), sugerindo que a infiltração de tais células conferisse pior prognóstico aos pacientes. Os resultados discrepantes entre os diferentes grupos de pesquisa reforça a necessidade de que mais estudos abordem a infiltração de células imunológicas em câncer diferenciado de tireoide como marcadores de prognóstico.

Nosso grupo estudou a expressão de FoxP3 em células de câncer diferenciado de tireoide. A expressão de FoxP3 foi inicialmente descrita como restrita ao tecido hematopoiético e é marcador de linfócitos Treg. Entretanto, achados recentes sugerem que outros tecidos e linhagens celulares também seriam capazes de expressar FoxP3 (114-117). Nossos dados demonstraram que FoxP3 é expressa não somente em linfócitos infiltrantes de tumores como também em citoplasma e núcleo de células foliculares. A expressão nuclear de FoxP3 foi mais intensa em

pacientes mais jovens e em pacientes com tumores metastáticos (118). De fato, embora crianças e adolescentes tendam a se apresentar com estágios avançados da doença e tenham alta probabilidade de metástase locorregional e à distância, eles geralmente exibem excelentes taxas de sobrevida (119). Em contraste, pacientes mais velhos experimentam um aumento da taxa de mortalidade em paralelo com a ocorrência de metástases (1, 24). A associação entre expressão nuclear de FoxP3 e presença de metástase e menor idade ao diagnóstico sugere que o sistema imunológico seja um componente importante para o entendimento do comportamento não usual do câncer diferenciado de tireoide na faixa etária pediátrica. Mais estudos, entretanto, são necessários para comprovar esta associação.

Justificativas

1. Carência de dados contundentes na literatura: poucos estudos investigaram a associação entre o perfil de resposta imunológica tumoral e características clínicas e anatomopatológicas de carcinomas diferenciados da tiroide;
2. Aplicabilidade imunoterápica: terapias anti-tumorais podem ser mais efetivas se combinadas com agentes que previnam a supressão da resposta anti-tumoral;
3. Planejamento terapêutico: identificação prévia de pacientes de pior prognóstico pode auxiliar no planejamento cirúrgico, aplicação de radioiodoterapia e seguimento, enquanto que pacientes com tendência a melhor evolução podem sofrer terapias menos agressivas;
4. Compreensão da imunologia antitumoral e aplicabilidade clínica: estudos clínicos que comparam eventos fisiológicos com evolução clínica, como o presente estudo, são fundamentais para a transposição do conhecimento básico para áreas de aplicação médica;
5. Novas estratégias terapêuticas poderão ser delineadas a partir da melhor compreensão da fisiologia e da patologia da resposta imunológica no câncer de tiroide.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o padrão de expressão proteica de tumores tiroideanos (tecidos benignos e tecidos malignos). Este padrão de expressão proteica incluiu caracterizar: (1) a presença de infiltração de linfócitos e macrófagos infiltrantes de tumores, (2) a funcionalidade destas células imunológicas e (3) o microambiente tumoral.

Com estes dados, pretendemos responder às seguintes perguntas:

1. A infiltração de células imunológicas é mais freqüente em tumores benignos ou malignos?
2. A infiltração de células imunológicas está correlacionada a características de maior ou menor agressividade tumoral?
3. A infiltração de células positivas para GRANZIMA B, CD25 ou CD69 é mais freqüente em tumores benignos ou malignos?
4. A infiltração de células positivas para GRANZIMA B, CD25 ou CD69 está correlacionada a características de maior ou menor agressividade tumoral?
5. A expressão de proteínas como COX2, IL-10, IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-17 e CD134 é mais freqüente em tumores benignos ou malignos?
6. A expressão de COX2, IL-10, IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-17, ROR- γ T e CD134 está correlacionada a um perfil de infiltração de células do sistema imunológico em tumores de tiroide?
7. A expressão de COX2, IL-10, IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-17, ROR- γ T e CD134 está correlacionada a características de maior ou menor agressividade tumoral?
8. Existe diferença no microambiente tumoral de crianças e adolescentes?

9. Existe diferença no microambiente inflamatório da metástase linfonodal se comparado ao tumor primário?

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center (Projeto de Pesquisa número 1259/09-B). Foram investigados retrospectivamente 437 pacientes com carcinoma diferenciado ou processos não malignos da tireoide, cujas amostras de tecido previamente fixadas em formalina e incluídas em blocos de parafina eram mantidas no Banco de Tecidos do A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil, conforme resumido na Tabela 2. Câncer bem diferenciado de tireoide foi diagnosticado em 305 pacientes: 252 com carcinoma papilífero e 53 com carcinoma folicular. Além disso, obtivemos 132 tecidos normais ou benignos de tireoide, incluindo: 18 casos de tecido normal, 58 bólios nodulares e 56 adenomas foliculares. Informações clínicas foram obtidas dos prontuários. Adicionalmente, obtivemos tecidos de metástases linfonodais ao diagnóstico de 25 pacientes. Para estes casos, fizemos análise pareada entre tecido metastático e tumor primário.

Tabela 2: Análise descritiva resumindo todos os pacientes estudados. Os dados são expressos em número absoluto.

Diagnóstico	histopatológico	Número de pacientes	Gênero		Idade		TLC concomitante	
			M	F	<45 anos	>45 anos	Presente	Ausente
Não maligno	Tecido normal	18	1	17	1	17	-	-
	Bócio nodular	58	8	50	20	38	-	-
	Adenoma folicular	56	9	47	27	29	-	-
	Total	132						
Maligno	Carcinoma papilífero							
	<i>Tipo Clássico</i>	154	29	125	97	57	46	108
	<i>Variante Folicular</i>	86	16	70	39	47	27	59
	<i>Pouco diferenciado</i>	12	2	10	4	8	4	8
	Carcinoma Folicular	53	12	41	15	38	15	38
	Total	305						

Abreviaturas: TLC, tiroidite linfocítica crônica; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

Observação: Tabela 4 para análise estatística; “-“ significa casos não avaliados.

Tecidos parafinados de todos os 437 casos foram revistos para confirmação diagnóstica e a fim de selecionar as áreas mais representativas para construir um “tissue microarray” (TMA, Beecher Instruments ®, Silver Springs, MD, EUA) para a análise imunoistoquímica. O TMA constou de 2 amostras de 1 mm de diâmetro de cada espécime, que foram selecionadas e coletadas para compor as lâminas a serem submetidas aos estudos imunoistoquímicos. Quando existente, o infiltrado inflamatório foi incluído nas amostras.

TLC foi investigada no parênquima tiroideano adjacente aos carcinomas diferenciados da

tiroide e os pacientes foram classificados de acordo com esta investigação em “TLC concomitante presente” e “TLC concomitante ausente”. Esta análise foi feita com auxílio do Professor José Vassallo. A presença de tiroidite foi caracterizada pela intensa infiltração linfocítica com formação de folículos linfóides, fibrose e atividade folicular regenerativa na forma de numerosos folículos pequenos, muitas vezes revestidos por células de Hürthle. Linfócitos e macrófagos infiltrantes de tumores foram avaliados por marcadores imunoistoquímicos. O perfil de expressão protéica dos tumores foi avaliado por imunoistoquímica. Ambos os dados imunológicos e de expressão protéica foram correlacionados com variáveis clinico-patológicas, tais como idade, sexo, grupo étnico, tamanho tumoral, multifocalidade, invasão extra-tiroideana, presença de metástase linfonodal ao diagnóstico, estadiamento e sobrevida livre de recidiva/metástase.

Os pacientes foram acompanhados com exames periódicos de Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI), TSH e tireoglobulina (Tg) séricos. A PCI consiste no exame de imagem que busca a presença de tecido iodo captante em diferentes regiões do corpo do paciente. Exames adicionais foram feitos de acordo com protocolo padronizado que incluía raios-X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada e outros procedimentos para detectar eventuais metástases distantes, por um período de 1 a 416 meses (Média $67,35 \pm 2,41$ meses; Mediana = 45 meses). Pacientes com Tg elevada foram submetidos à PCI. Tumores recorrentes e/ou apresentando metástases distantes foram definidos de acordo com os parâmetros acima referidos. Agressividade ao diagnóstico foi determinada segundo o sistema TNM de classificação e estadiamento de carcinoma diferenciado de tiroide (32).

Imunoistoquímica (IQ)

Seções de cinco micrômetros do TMA foram colocadas em lâminas eletricamente carregadas, desparafinadas e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 3% por 15 minutos. Todos os cortes de tecido foram submetidas ao calor para recuperação antigênica com uso de tampão citrato 10% (10mM, pH 6,0) em um recipiente a vapor (90° C durante 30 minutos). Secções de tecidos foram incubadas por 12 a 16 horas a 6° C com anticorpos primários listados na Tabela 3. O sistema de detecção livre de biotina *advanced* foi utilizado segundo instruções do fabricante (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Foi aplicado DAB (3,3 - tetrahidrocloreto-diaminobenzidina; Sigma, St Louis, MA, EUA) como cromógeno por 5 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Os controles positivos e negativos foram executados no mesmo lote de reação.

Dividimos os marcadores imunoistoquímicos em três grandes grupos: (a) marcadores de células imunológicas (figura 4), (b) marcadores de atividade das células imunológicas (figura 5) e (c) marcadores inflamatórios das células tumorais (figura 6). Os marcadores de células imunológicas são aqueles utilizados para avaliar subconjunto de linfócitos e macrófagos infiltrantes de tumores, como CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD45RO, CD68 e FOXP3. Os marcadores de atividade das células imunológicas fornecem embasamento para verificar se determinada célula do sistema imunológico está ou não ativada, como CD69, CD25 e GRANZIMA B. Por sua vez, os marcadores inflamatórios das células tumorais são proteínas que uma vez produzidas pelas células tumorais favorecem ou desfavorecem um microambiente pró-inflamatório, como COX2, IL-17A, IL-1 β , IL-10, IL-6, CD134 e IL-23. Uma vez que nem todos os casos tiveram amostras de tecidos suficiente para todos os ensaios de marcadores, nem todas

as avaliações estatísticas feitas neste estudo o foram com o total de casos disponíveis. A expressão de ROR- γ T, por exemplo, foi possível apenas para 62 amostras de tecidos malignos.

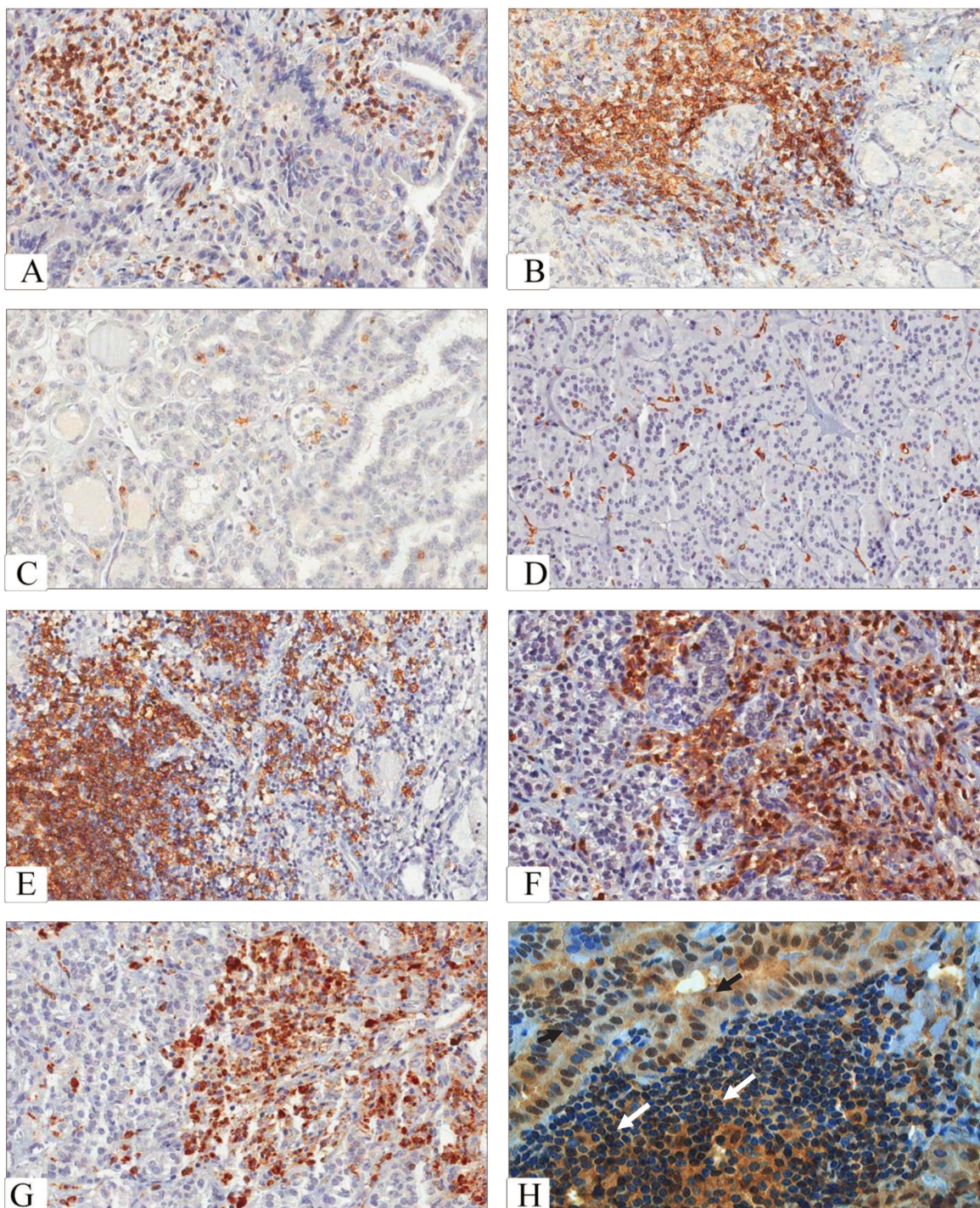


Figura 4: Paineis de células do sistema imunológico em carcinomas papilíferos da tireoide. Todas as imagens correspondem à reatividade imunoistoquímica para cada um dos marcadores, evidenciada pela coloração marrom na membrana dos linfócitos. (A) Infiltração de linfócitos CD3+ (100x), que é um marcador pan-T. (B) Infiltração intra tumoral de linfócitos T CD4+ (100x). Linfócitos T CD4+ (T auxiliares) infiltram-se de modo massivo entre as papilas. (C) Infiltração de linfócitos T CD8+ (T citotóxicos; 100x), que se infiltram de modo esparsos entre as células tumorais. (D) Infiltração de linfócitos CD16+ (linfócitos natural killer; 100x). (E) Linfócitos CD20+ (linfócitos B; 100x) infiltrando maciçamente tecido tumoral tireoideano. (F) Infiltração de linfócitos CD45RO+ (T de memória; 100x). (G) Infiltração de macrófagos associados a tumores (CD68+; 100x). (H) Linfócitos T regulatórios (FoxP3+; setas brancas) infiltrando tecido tumoral tireoideano (200x). Notar que células de carcinoma papilífero (setas pretas) também apresentam expressão tanto citoplasmática quanto nuclear de FoxP3.

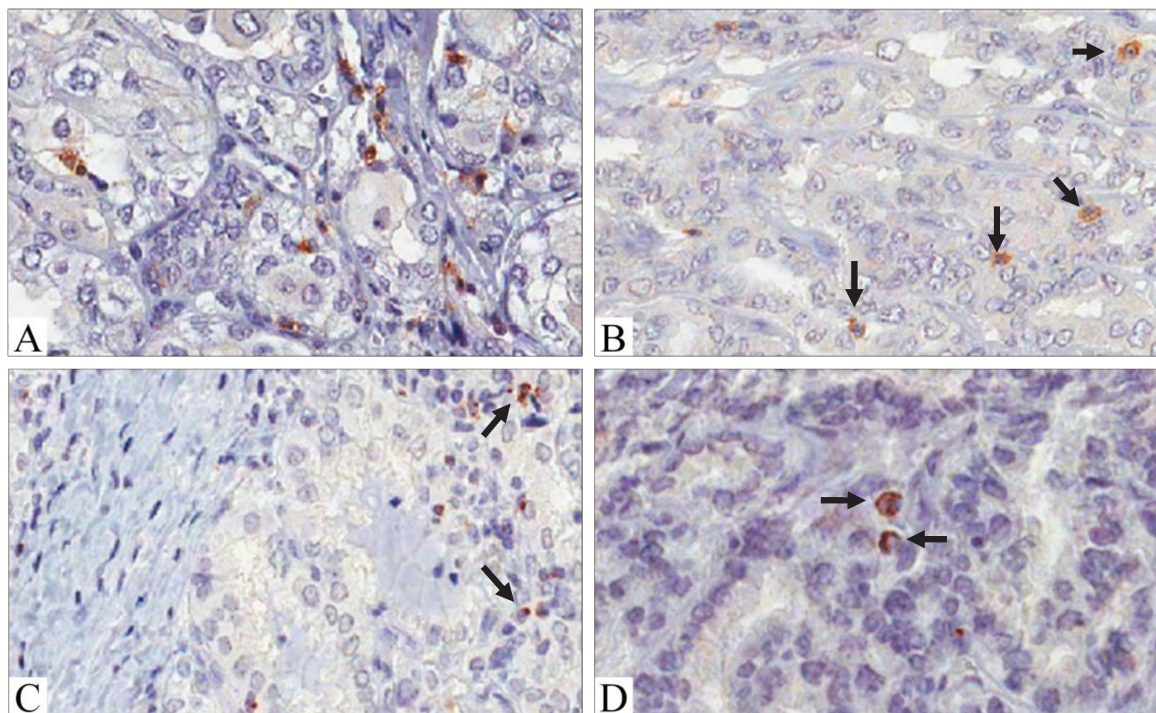


Figura 5: Painel de linfócitos infiltrantes de tumores de carcinomas papilíferos. Todas estas reações imunoistoquímicas marcam a expressão de proteínas relacionadas à ativação linfocitária. Notar que os linfócitos ativados estão dispersamente distribuídos entre as células malignas. (A) Linfócitos expressando CD25 (200x). (B) Linfócitos expressando CD69 (200x; setas pretas indicam os linfócitos CD69+). Linfócitos expressando GRANZIMA B: (C) aumento de 200x, com setas pretas indicando linfócitos GRANZIMA B+ e (D) aumento de 300x. (D) Maior aumento mostrando os linfócitos GRANZIMA B+ (setas pretas), que são células pequenas, com cromatina condensada e localizam-se próximas de células tumorais. Notar que a expressão de GRANZIMA B apresenta padrão granular. Células tumorais, por sua vez, são grandes, com citoplasma abundante e núcleos grandes típicos com coloração em vidro fosco.

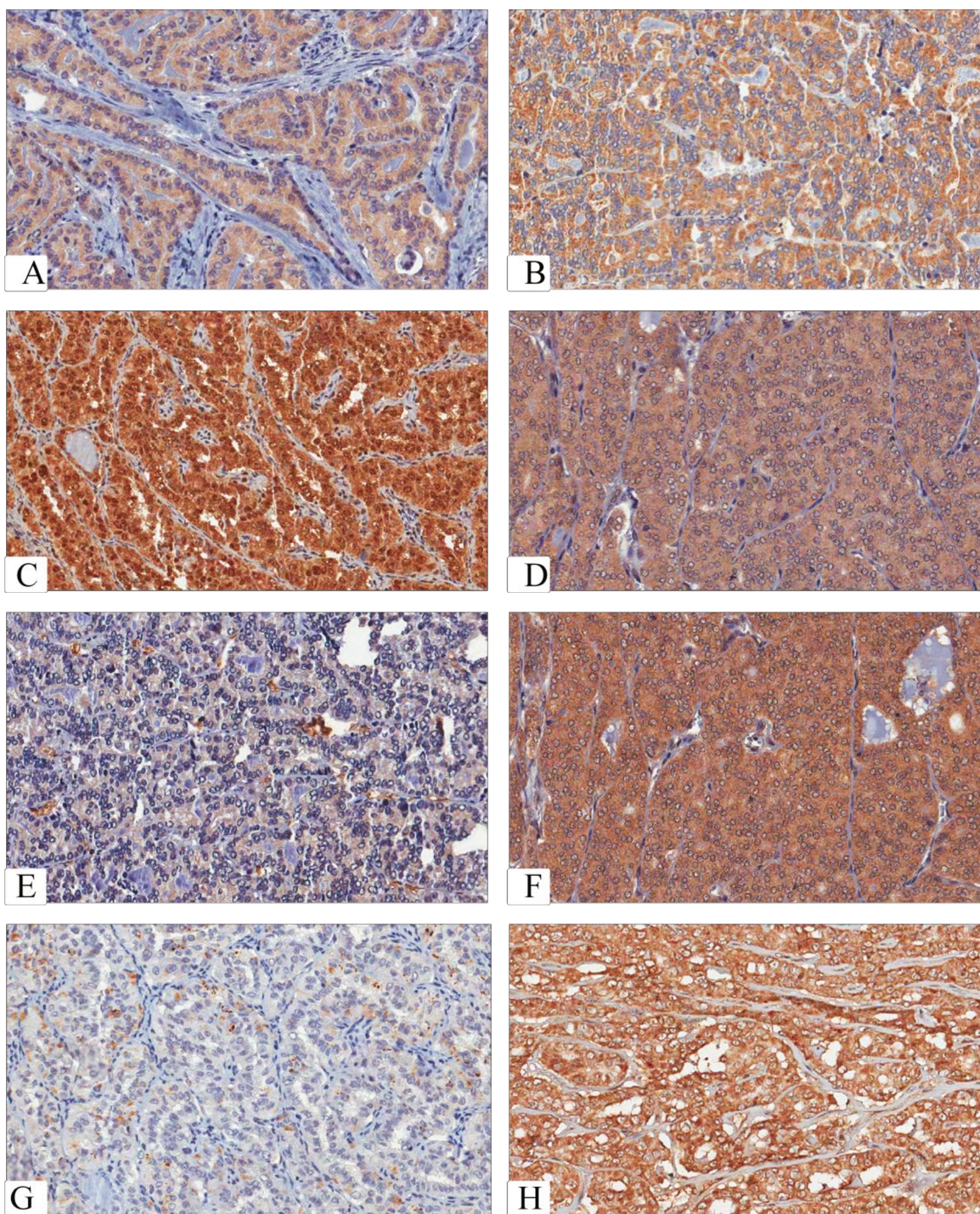


Figura 6: Painel de expressão de proteínas inflamatórias. Todas as proteínas em questão são expressas pelas células tumorais tiroideanas. (A) Expressão de COX2, que encontra-se difusamente expressa no citoplasma das células tumorais. (B) Expressão de CD134, intensa e difusamente marcada no citoplasma de células tumorais. (C) Expressão de IL-10, com forte e difusa marcação citoplasmática. (D) Expressão de IL-23, que apresentou expressão homogênea,

citoplasmática e difusa entre as células tumorais. (E) Expressão de IL-6 com padrão citoplasmático e multifocal. (F) Expressão de IL-1 β , com intensa marcação citoplasmática, difusamente expressa em todo tecido tumoral. (G) Expressão de IL-17A, com predomínio de padrão citoplasmático e multifocal. (H) Expressão de ROR- γ T, com intensa marcação citoplasmática. Notar que, mesmo sendo um fator de transcrição, não apresentou expressão nuclear. Todas as imagens foram obtidas com magnificação de 100x.

Tabela 3: Especificações dos marcadores imunoistoquímicos.

Categoria	Marcador	Clone	Diluição	Empresa	Função fisiopatológica
Marcadores de células imunológicas	CD3	Policlonal de Coelho	1:500	DAKO	Marcador de Linfócitos Pan-T
	CD20	Monoclonal L26	1:1000	DAKO	Marcador de Linfócitos B
	CD4	Monoclonal 1F6	1:100	Novocastra	Marcador de Linfócitos T auxiliares
	CD8	Monoclonal SP16	1:100	Thermo Scientific	Marcador de Linfócitos T citotóxicos
	CD68	Monoclonal KP1	1:1000	DAKO	Marcador de Macrófagos
	FoxP3	Monoclonal 236A/E7	1:500	Abcam	Marcador de Linfócitos T regulatórios
	CD16	Monoclonal 2H7	Pré-diluído	Abcam	Marcador de linfócitos natural killer (NK)
	CD45RO	Monoclonal UCHL-1	1:10	DAKO	Identifica os linfócitos T de memória
Atividade das células imunológicas	GRANZIMA B	GrB-7	1:300	DAKO	Identifica os linfócitos T ativados
	CD25	Monoclonal 4C9	1:100	Leica	Receptor de IL-2, que identifica ativação linfocitária
	CD69	Monoclonal CH11	1:25	Abcam	Transdução de sinal envolvida na proliferação e ativação de linfócitos T, NK
Marcadores inflamatórios das células tumorais	COX2	Monoclonal GrB7	1:5000	DAKO	Enzima que leva à produção de prostaglandinas
	CD134	Monoclonal MM0505-8S23	1:100	Santa Cruz	Molécula coestimulatória envolvida na resposta mediada por linfócitos CD4+ e B
	IL-10	Policlonal de Coelho	1:100	Abcam	Interleucina que inibe a expressão de citocinas Th1 e MHCII.
	IL-23	Monoclonal P19[HLT2736]	1:100	Abcam	Estimula a produção de interferon gama, levando a cronificação da inflamação. É requerida para diferenciação de células Th17 a partir de Th0
	IL-6	Policlonal de Coelho	1:100	Abcam	Produzida em locais de inflamação aguda ou crônica, tem papel da maturação de linfócitos B e diferenciação de células Th17
	IL-1 β	Monoclonal [11E5]	1:50	Abcam	Importante mediadora da resposta inflamatória envolvida em inúmeras atividades celulares, incluindo proliferação diferenciação e apoptose
	IL-17	Monoclonal eBio64DEC17	1:50	eBioscience	Papel proinflamatório. Estimula a expressão de IL-6 e está associada a cronificação do processo inflamatório
	ROR- γ T	Policlonal de Coelho	1:20	Abcam	Fator de transcrição que exerce função fundamental na diferenciação de Th17

Informações dos fabricantes: DAKO (Carpenteria, CA, EUA), Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK), Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA), Chemicon International (Temecula, CA, EUA), SantaCruz Biotechnology (SantaCruz, CA, EUA), Abcam (Cambridge, UK) and Epitomics (Burlingame, CA, EUA).

Avaliação da IQ

O resultado das reações imunoistoquímicas foi avaliado com auxílio do Professor José Vassallo. As células foram consideradas positivas para os marcadores imunoistoquímicos quando uma coloração marrom clara foi observada na típica localização celular. A avaliação dos marcadores de células do sistema imunológico e da atividade das mesmas foi feita para cada amostra tecidual, estimando o número de células positivas. O número de células positivas foi classificado como: 0 = nenhuma célula positiva, 1 = até 10 células positivas, 2 = mais de 10 células positivas. A figura 5 mostra um painel da infiltração de algumas destas células do sistema imunológico.

Os marcadores inflamatórios das células tumorais foram avaliados pela estimativa da porcentagem de células tumorais positivas e a intensidade da coloração. A porcentagem de células positivas foi classificada como: 0 = nenhuma célula positiva, 1 = até 25% de células positivas, 2 = 25-50% de células positivas, 3 = 50-75% de células positivas, 4 = mais de 75% de células positivas. A intensidade foi classificada como: 0 = negativo, 1 = leve coloração, 2 = moderada coloração, 3 = forte coloração. A pontuação final foi calculada somando os dois, a porcentagem de células positivas e a intensidade da marcação, que variou entre 0 e 7. Para fins estatísticos, os casos classificados como 0 e 2 foram agrupados e chamados de "negativo" e os casos que receberam pontuação 3-7 foram chamados de "positivo".

Análise de metástases linfonodais

Tecidos de metástases linfonodais pareados com tecidos de tumores primários estavam disponíveis para análise de 25 pacientes. Isso nos permitiu estudar mais aprofundadamente o microambiente inflamatório em ambos os tecidos. As lâminas foram digitalizadas usando o Sistema Apério (Vista, CA, USA) e avaliadas por meio do software SCANSCOPE (Apério). Dois diferentes algoritmos foram utilizados: (a) identificação de células do sistema imunológico e (b) quantificação da expressão das proteínas nas células tumorais. A identificação de células tem como resultado a densidade de células positivas expressa na razão entre o número de células positivas pelo número total de células no spot tecidual analisado. A quantificação da expressão de proteínas tumorais foi feita pelo mesmo software, que nos fornece um resultado quantitativo baseado na quantidade e na intensidade de células marcadas, variando de 0 (nenhuma célula positiva) a 1 (todas as células intensamente positivas).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ® software, versão 13.0. Sobrevida livre de recorrência foi calculada utilizando-se curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com análise de log-rank. Análise não paramétrica foi realizada utilizando Teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Um modelo de regressão logística multivariada foi aplicado usando as características clínicas e anatomopatológicas como variáveis dependentes e as variáveis imunológicas como variáveis explanatórias. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar medidas contínuas entre dois grupos cuja variável não apresentava distribuição normal; Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar três ou mais grupos cujas variáveis não apresentaram distribuição normal. Teste T ou teste ANOVA foram utilizados para

variáveis que apresentavam distribuição normal, comparando dois ou três ou mais grupos, respectivamente. Teste T pareado foi usado para comparar o microambiente dos tumores primários e respectivas metástases linfonodais. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi utilizado para análise de sobrevida multivariada, com critério *step-wise* de seleção de variáveis. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A maioria dos pacientes era do sexo feminino (n=360; 82,4%) e 17,6% dos pacientes eram do sexo masculino (n=77). Entre os 132 pacientes com doença benigna da tireoide, a idade média no momento do diagnóstico foi de $49,29 \pm 15,18$ anos (média $\pm$ desvio padrão). Dentre aqueles 305 com o câncer de tireoide, a idade média foi de $44,13 \pm 16,44$ anos. A média do tamanho tumoral foi de $3,00 \pm 2,21$ cm. A maioria dos pacientes foi diagnosticada em estágios iniciais da doença (59,2% em estágio I; 12,9% em II; 12,2% em III e 15,7% em IV). Houve invasão extratiroideana em 53,3% dos casos e os tumores eram unifocais em 58,7% dos pacientes.

A presença de TLC concomitante se correlacionou a características de menor agressividade tumoral. A TLC concomitante se associou ao sexo feminino ($p=0,001$), à menor dose acumulada de ablação actínica ($p=0,010$), ao menor tamanho tumoral ($p<0,001$), à ausência de invasão extratiroideana ($p=0,002$) e à ausência de metástase ao diagnóstico ($p<0,001$). Tumores que apresentavam TLC concomitante frequentemente apresentavam infiltração intratumoral de diversas células do sistema imunológico, que incluem macrófagos ($p=0,005$), linfócitos T ($p<0,001$), linfócitos T auxiliares ($p<0,001$), linfócitos T citotóxicos ($p<0,001$), linfócitos NK ($p=0,025$), linfócitos T de memória ($p=0,002$) e linfócitos B ($p<0,001$). A presença de TLC concomitante se associou à infiltração intra-tumoral de linfócitos CD69+ ($p=0,008$), mas não à infiltração de linfócitos GRANZIMA B+ e CD25+. Não observamos associação entre a presença de TLC concomitante e a expressão de marcadores inflamatórios tumorais.

Células do sistema imune e variáveis clínicas e anatomopatológicas

A tabela 4 mostra a distribuição numérica de cada marcador de células do sistema imunológico em todos os tecidos analisados.

Tabela 4: Distribuição das diferentes categorias dos marcadores de células do sistema imunológico em todos os tecidos analisados.

Variável	Categoria	N	%
Linfócitos T	Ausência de células	272	62,2
	Até 10 células	40	9,2
	Mais que 10 células	125	28,5
Linfócitos T auxiliares	Ausência de células	344	78,7
	Até 10 células	27	6,2
	Mais que 10 células	66	15,1
Linfócitos T citotóxicos	Ausência de células	229	52,4
	Até 10 células	113	25,9
	Mais que 10 células	95	21,7
Linfócitos B	Ausência de células	367	83,9
	Até 10 células	12	2,8
	Mais que 10 células	58	13,3
Linfócitos NK	Ausência de células	92	21,1
	Até 10 células	89	20,4
	Mais que 10 células	256	58,5
Linfócitos Treg	Ausência de células	401	91,7
	Até 10 células	3	0,7
	Mais que 10 células	33	7,6
Macrófagos	Ausência de células	169	38,8
	Até 10 células	134	30,6
	Mais que 10 células	134	30,6
Linfócitos T de memória	Ausência de células	154	35,3
	Até 10 células	114	26,1
	Mais que 10 células	169	38,6

A tabela 5 resume os resultados das associações entre infiltração de células do sistema imunológico e características clínicas e anatomopatológicas. O marcador CD3 é conhecido por evidenciar linfócitos T (marcador pan-T linfocítico). Observamos que 48,8% dos tecidos malignos apresentaram infiltração de linfócitos T, enquanto que apenas 5,8% dos tecidos benignos apresentaram infiltração destas células ($p < 0,001$). Dos tecidos que apresentavam cápsula fibrótica, 63,2% apresentaram infiltração de linfócitos T, enquanto que apenas 37,5% dos tecidos sem cápsula mostraram infiltração destes linfócitos ($p = 0,004$). A presença de linfócitos T foi mais frequente em tecidos de pacientes que apresentaram metástase ao diagnóstico (61%) do que em tecido de pacientes que não apresentaram metástase (40,2%; $p = 0,004$). Entretanto, não observamos correlação entre a infiltração de linfócitos T e estadiamento, tamanho tumoral, invasão extra-tiroideana e multifocalidade.

Tabela 5: Resumo das associações entre variáveis clínicas e anatomopatológicas e infiltração de células do sistema imunológico.

Variável clínica e anatomopatológica	Linfócitos T	Linfócitos T auxiliares	Linfócitos T citotóxicos	Linfócitos B	Linfócitos NK	Linfócitos Treg	Macrófagos	Linfócitos T de memória
Mais frequente em tumores malignos	RD	RD	RD	RD	RD	RD	RD	RD
Idade ao diagnóstico			RI	RI	RI		RI	
Tamanho tumoral			RI		RD	RI		
Dose acumulada de radioiodoterapia					RD			
Diferenciação		RI						RI
Multifocalidade								RD
Encapsulamento	RD		RI		RI			RI
Invasão extratiroideana		RI	RI	RI		RI		
Metástase ao diagnóstico	RD						RD	RD

Abreviações: RD: relação direta entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. RI: relação inversa entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. Em azul, associação mostra-se favorável ao paciente. Em vermelho, associação mostra-se desfavorável ao paciente.

Os linfócitos T podem ser classificados em dois grandes grupos: CD4+ (auxiliares) e CD8+ (citotóxicos). Os linfócitos T auxiliares foram mais frequentemente encontrados em tecidos malignos (27,5%) do que em tecidos benignos (2,3%; $p < 0,001$). Linfócitos T auxiliares foram mais frequentes entre tumores pouco diferenciados (72,7%) do que entre tumores bem diferenciados (29,8%). Estes linfócitos foram pouco frequentes em tecidos que apresentaram invasão extra-tiroideana (21,3%) se comparado a tecidos que se apresentaram confinados ao limite tiroideano (41,5%; $p = 0,002$). Não observamos associação entre infiltração de linfócitos T auxiliares e demais variáveis clinico-patológicas.

A infiltração por linfócitos T citotóxicos foi mais frequente entre tumores malignos (51,7%) do que entre tecidos benignos (35,1%; $p=0,007$). Pacientes cujos tumores apresentaram infiltração de linfócitos T citotóxicos foram diagnosticados mais jovens (média de 43,5 anos) do que pacientes cujos tumores não apresentaram infiltração destes linfócitos (média de 47,5 anos; $p=0,006$). Infiltração destes linfócitos foi mais frequente em tumores não encapsulados (41,3% dos encapsulados versus 60,2% dos não encapsulados; $p=0,04$). Observamos que 40,7% dos tumores sem invasão extra-tiroideana apresentaram-se com mais de 10 linfócitos T citotóxicos, enquanto que apenas 23,2% dos tumores com invasão extra-tiroideana apresentaram mais que 10 linfócitos T citotóxicos ($p=0,006$). Curiosamente, estes linfócitos foram encontrados em 66,6% dos tumores que se apresentaram com metástase ao diagnóstico, enquanto que 52,8% dos tumores que não se apresentaram com metástase continham infiltração de linfócitos T citotóxicos ($p=0,06$). Por outro lado, observamos uma associação entre infiltração de linfócitos T citotóxicos e menor tamanho tumoral ($p=0,038$). Não observamos associação entre a presença de linfócitos T citotóxicos e as demais variáveis clínico-patológicas.

O marcador CD20 mostra a infiltração de linfócitos B. Esta infiltração foi identificada em 22,7% dos tecidos malignos e em apenas 1,8% dos tecidos benignos ($p<0,001$). Pacientes cujos tumores se apresentaram infiltrados por linfócitos B foram diagnosticados em idade mais precoce (com linfócitos B, 43,4 anos; sem linfócitos B, 47,5 anos; $p=0,016$). Observamos que 25,9% dos tumores sem invasão extratiroideana apresentaram mais que 10 linfócitos B, enquanto que apenas 13,5% dos tumores com invasão apresentaram mais que 10 linfócitos B ($p=0,035$). Não observamos associação entre infiltração de linfócitos B e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.

CD16 evidencia a infiltração de linfócitos NK. Neste caso em especial, observamos que as associações com variáveis clínicas e anatomopatológicas foram encontradas quando categorizamos a infiltração destes linfócitos comparando ter mais que 10 células versus ter menos que 10 destes linfócitos. De fato, 72,9% dos tecidos malignos apresentaram mais que 10 linfócitos NK infiltrando áreas tumorais, enquanto que apenas 36,9% dos tecidos benignos apresentaram mais que 10 linfócitos NK ($p<0,001$). Observamos associação entre a infiltração de mais de 10 linfócitos NK e menor idade ao diagnóstico ($p=0,011$). A maioria dos tecidos não encapsulados (89,2%) apresentaram mais que 10 linfócitos NK, enquanto que 55,5% dos tecidos com cápsula fibrótica apresentaram mais que 10 linfócitos NK ($p=0,003$). Tumores que apresentaram mais que 10 linfócitos NK eram maiores (média de 3,6 cm) do que tumores que apresentaram menos que 10 linfócitos NK (2,1 cm; $p<0,001$). Pacientes cujos tumores apresentaram mais que 10 linfócitos NK foram submetidos a maiores doses acumuladas de radioiodoterapia (média de 269,6 mCi) se comparados a pacientes cujos tumores apresentaram menos que 10 linfócitos NK (193,7 mCi; $p=0,046$).

Os linfócitos Treg são evidenciados pela expressão da proteína FOXP3. Nenhum dos tecidos benignos apresentou infiltração destes linfócitos. Entretanto, 17% dos carcinomas papilíferos apresentaram infiltração de linfócitos FoxP3+ e não detectamos infiltração de linfócitos Treg em carcinomas foliculares. A infiltração de linfócitos Treg se associou à ausência de invasão extratiroideana ($p=0.012$) e ao menor tamanho tumoral ($p=0.007$).

O marcador CD68 mostra a presença de macrófagos. Nossos resultados mostraram que 73,6% dos tecidos malignos apresentaram infiltração por macrófagos, enquanto estas células foram notadas em apenas 33,9% dos tecidos benignos ($p<0,001$). Observamos associação entre infiltração de macrófagos e menor idade do diagnóstico ($p=0,011$). Pouco mais da metade

(54,5%) dos tumores que apresentaram metástase ao diagnóstico apresentaram mais que 10 macrófagos infiltrantes de tumor. Entretanto, 39,6% dos tumores que não apresentaram metástase ao diagnóstico apresentaram mais que 10 macrófagos infiltrantes de tumores ($p=0,046$).

Os linfócitos T de memória são observados pela expressão de CD45RO. Em 71,3% dos tumores malignos foi observada infiltração de linfócitos T de memória, enquanto que 54,9% dos tecidos benignos apresentaram infiltração destes linfócitos ($p=0,005$). Linfócitos T de memória foram mais frequentemente encontrados entre os tumores multifocais (83,5%) do que entre tumores unicocais (67,6%; $p=0,031$). Observamos que 58,6% dos tumores não encapsulados apresentaram mais que 10 linfócitos T de memória, enquanto que apenas 18,2% dos tumores encapsulados apresentaram infiltração destes linfócitos ($p=0,002$). Todos os tumores pouco diferenciados apresentaram mais que 10 linfócitos T de memória, enquanto que apenas 49,5% dos tumores bem diferenciados apresentaram infiltração por linfócitos T de memória. Ainda, 63,7% dos tumores que apresentaram metástase ao diagnóstico apresentaram infiltração de mais de 10 linfócitos T de memória, enquanto que 44,7% dos tumores que não apresentaram metástase ao diagnóstico apresentaram infiltração de mais de 10 linfócitos T de memória ($p=0,027$). Não observamos associação entre infiltração de linfócitos T de memória e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.

Ativação de células do sistema imune e variáveis clínicas e anatomopatológicas

A tabela 6 mostra a distribuição numérica de cada marcador de células do sistema imunológico em todos os tecidos analisados.

Tabela 6: Distribuição das diferentes categorias dos marcadores de atividade das células do sistema imunológico em todos os tecidos analisados.

Variável	Categoria	N	%
GRANZIMA B	Ausência de células	380	87,0
	Até 10 células	47	10,7
	Mais que 10 células	10	2,3
CD69	Ausência de células	279	63,8
	Até 10 células	71	16,2
	Mais que 10 células	88	20,1
CD25	Ausência de células	360	82,5
	Até 10 células	39	8,9
	Mais que 10 células	38	8,6

A presença de linfócitos ativados foi um achado raro nos espécimes estudados. Esse resultado nos sugere que a massiva infiltração leucocitária observada em muitos tecidos benignos e malignos seja majoritariamente composta por linfócitos não ativados e que, por isso, não seriam capazes de desencadear uma resposta imunológica anti-tumoral efetiva.

A presença de linfócitos GRANZIMA B+ foi mais frequente entre os tumores malignos (16,6%) do que entre os tecidos benignos (8,13%; $p=0,037$). Observamos que 24,6% dos tumores que apresentaram invasão extra-tiroideana apresentaram infiltração de linfócitos GRANZIMA B+, enquanto que 11,5% dos tumores sem invasão mostraram infiltração destes linfócitos ($p=0,053$). Não observamos associação entre a infiltração de linfócitos GRANZIMA B+ e demais variáveis estudadas.

A infiltração de linfócitos CD69+ foi demonstrada em 49,7% dos tumores malignos, enquanto que apenas 16,5% dos tecidos benignos apresentaram estes linfócitos ativados ($p < 0,001$). A infiltração de mais de 10 linfócitos CD69+ foi mais frequente entre os tumores não encapsulados (33,8%) se comparado a tumores com cápsula fibrótica (8,69%; $p = 0,025$). Ainda, 71,1% dos tumores que apresentaram metástase ao diagnóstico apresentaram infiltração de linfócitos CD69+, enquanto que 46,5% dos tumores que não apresentaram metástase continham infiltração destes linfócitos ($p = 0,003$). Não notamos associação entre a infiltração de linfócitos CD69+ e demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.

A infiltração de linfócitos CD25+ foi mais frequente entre os tumores malignos (21,8%) do que entre os tecidos benignos (10,8%; $p = 0,018$). Nossos resultados mostraram que 36,6% dos tumores pouco diferenciados apresentaram mais de 10 linfócitos CD25+, enquanto que apenas 7,43% dos tumores bem diferenciados apresentaram mais de 10 linfócitos CD25+ ($p = 0,013$). Também observamos que 32,7% dos tumores que apresentaram metástase ao diagnóstico apresentaram infiltração de linfócitos CD25+, enquanto que 16,4% dos tumores que não apresentaram metástase ao diagnóstico continham infiltração destes linfócitos ativados ($p = 0,027$). Não conseguimos observar associação entre as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas e infiltração de linfócitos CD25+. A tabela 7 resume os achados significantes acima relatados.

Tabela 7: Resumo das associações significativas entre infiltração de linfócitos ativados e características clínicas e anatomopatológicas.

Variável clínica e anatomopatológica	Linfócitos GRANZIMA B+	Linfócitos CD69+	Linfócitos CD25+
Mais frequente em tumores malignos	RD	RD	RD
Idado ao diagnóstico			
Tamanho tumoral			
Dose acumulada de radioiodoterapia			
Diferenciação			RI
Multifocalidade			
Encapsulamento		RI	
Invasão extratiroideana			
Metástase ao diagnóstico		RD	RD

Abreviações: RD: relação direta entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. RI: relação inversa entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. Em vermelho, associação mostra-se desfavorável ao paciente.

Perfil de expressão de marcadores inflamatórios pela neoplasia e variáveis clínicas e anatomopatológicas

A tabela 8 mostra a distribuição dos tecidos analisados conforme a expressão dos marcadores inflamatórios.

Tabela 8: Distribuição das diferentes categorias dos marcadores inflamatórios expressos pelas células foliculares normais ou tumorais.

Variável	Categoria	N	%
COX2	negativo	210	48.1
	positivo	227	51.9
CD134	negativo	56	12.9
	positivo	381	87.1
IL-10	negativo	37	8.5
	positivo	400	91.5
IL-23	negativo	136	31.1
	positivo	301	68.9
IL-6	negativo	193	44.2
	positivo	244	55.8
IL-1 β	negativo	215	49.1
	positivo	222	50.9
IL-17A	negativo	359	82.0
	positivo	78	18.0
ROR- γ T	negativo	0	0.0
	positivo	62	100.0

A tabela 9 resume as associações significativas entre perfil de expressão de marcadores inflamatórios e características clínicas e anatomopatológicas. A expressão de COX2 foi observada em 60,9% dos tumores malignos, enquanto que apenas 35,6% dos tumores benignos apresentavam expressão de COX2 ($p < 0,001$). Considerando apenas os tumores malignos, não foi

observada correlação entre a expressão de COX2 e multifocalidade, encapsulamento do tumor, invasão extra-tiroideana, estadiamento tumoral e tamanho do tumor. Observamos que 68,9% dos casos que se apresentavam com metástase ao diagnóstico apresentavam expressão de COX2, enquanto que 52,4% dos casos sem metástase ao diagnóstico apresentavam expressão de COX2 ($p=0,057$).

CD134 foi mais frequentemente expresso entre tecidos malignos (93,9%) do que entre tecidos benignos (76,5%; $p<0,001$). Observamos que 90,4% das mulheres apresentavam tumores positivos para CD134, enquanto que 77,7% dos homens apresentaram expressão tumoral de CD134 ($p=0,037$). Todos os tecidos que apresentaram invasão extratiroideana expressaram CD134, enquanto que 87,8% dos tumores sem invasão expressaram CD134 ($p=0,006$). Não notamos correlação entre expressão de CD134 e demais características clínicas e anatomopatológicas.

Quase todos os tecidos malignos expressaram IL-10 (97,5%), enquanto que 82,3% dos tecidos benignos expressaram IL-10 ($p<0,001$). Não observamos correlação entre expressão de IL-10 e multifocalidade, encapsulamento tumoral, invasão extra-tiroideana e estadiamento tumoral.

Dos tumores malignos, 75,8% expressavam IL-23, enquanto que apenas 58,6% dos tumores benignos expressavam IL-23 ($p=0,002$). Observamos que a expressão de IL-23 foi positiva em 81,4% dos casos com invasão extra-tiroideana, enquanto que 62,8% dos casos sem invasão extra-tiroideana foram positivos para IL-23 ($p=0,023$). IL-23 foi mais frequentemente positiva em tecidos de mulheres (72,7%) do que tecidos de homens (56,8%; $p=0,029$). Tumores que expressaram IL-23 eram maiores (média de 3,7 cm) do que tumores que não expressaram IL-23 (média de 2,6 cm; $p=0,010$). Pacientes cujos tumores apresentaram expressão de IL-23 foram

submetidos a maiores doses acumuladas de radioiodoterapia (média de 291,1 mCi) do que pacientes cujos tumores não apresentaram expressão de IL-23 (média de 154 mCi; $p=0,041$). Não observamos correlação entre expressão de IL-23 e multifocalidade, encapsulamento tumoral, metástase ao diagnóstico e estadiamento tumoral.

Dentre os tecidos malignos, 66,6% apresentavam expressão de IL-6, enquanto que 41,1% dos tecidos benignos apresentavam expressão de IL-6 ($p<0,001$). Considerando apenas os tumores malignos, 44,4% dos tumores que apresentaram encapsulamento fibrótico expressaram IL-6, enquanto que 75% dos tumores sem encapsulamento expressaram IL-6 ($p=0,022$). Não encontramos correlação entre a expressão de IL-6 e multifocalidade, invasão extra-tiroideana, metástase ao diagnóstico, estadiamento e tamanho tumoral.

A expressão de IL-1 β foi observada em 63,9% dos tumores malignos, enquanto que apenas 31,5% dos tumores benignos apresentaram expressão de IL-1 β ($p<0,001$). Considerando apenas tumores malignos, não foi observada correlação entre multifocalidade, encapsulamento tumoral e estadiamento. A expressão de IL-1 β foi mais frequente entre tumores pouco diferenciados (90,9%) do que entre tumores bem diferenciados (58,2%; $p=0,049$). Dos tumores que apresentaram invasão extra-tiroideana ao diagnóstico, 71,2% destes apresentaram expressão de IL-1 β , enquanto que IL-1 β foi expressa em 53,3% dos tumores que não apresentaram invasão extra-tiroideana ($p=0,050$). Tumores que expressaram IL-1 β eram maiores (média de 3,78 cm) do que tumores que não expressaram IL-1 β (2,61 cm; $p=0,001$). Pacientes cujos tumores apresentaram expressão de IL-1 β foram submetidos a maiores doses acumuladas de radioiodoterapia (média de 316,2 mCi) do que pacientes cujos tumores não apresentaram expressão desta proteína (média de 152,9 mCi; $p=0,003$). A expressão de IL-1 β foi observada em

74% dos pacientes que apresentaram metástase ao diagnóstico, enquanto que 54% dos pacientes sem metástase ao diagnóstico apresentaram expressão de IL-1 β (p=0,029).

Notamos que IL-17A estava expressa em 25,6% dos tumores malignos, enquanto que apenas 4,5% dos tumores benignos expressavam IL-17A (p<0,001). Não foi encontrada correlação entre a expressão de IL-17A e características de agressividade tumoral, como multifocalidade, encapsulamento tumoral, invasão extra-tiroidieana, metástase ao diagnóstico, estadiamento tumoral e tamanho dos tumores.

Dos 62 tecidos disponíveis para avaliação da expressão de ROR- γ T, todos apresentaram expressão deste fator de transcrição. Entretanto, algo nos chamou atenção. Apenas 37,9% destes tecidos apresentaram expressão nuclear de ROR- γ T, enquanto que os demais apresentaram expressão citoplasmática apenas. Metade dos tumores unifocais apresentaram expressão nuclear de ROR- γ T, enquanto que apenas 26,6% dos tumores multifocais apresentaram expressão nuclear desta proteína (p=0,067). A maioria dos tumores que se apresentaram com metástase ao diagnóstico apresentaram expressão citoplasmática de ROR- γ T (76,9%), enquanto que metade dos tumores que se apresentaram sem metástase ao diagnóstico apresentaram expressão nuclear de ROR- γ T (p=0,035). Não observamos correlação entre a sub-localização celular de ROR- γ T e demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.

Tabela 9: Resumo das associações significativas entre perfil de expressão de marcadores inflamatórios e características clínicas e anatomopatológicas.

Variável clínica e anatomopatológica	COX2	CD134	IL-10	IL-23	IL-6	IL-1 β	IL-17	ROR- γ T
Mais frequente em tumores malignos	RD	RD	RD	RD	RD	RD	RD	
Idado ao diagnóstico								
Tamanho tumoral				RD		RD		
Dose acumulada de radioiodoterapia				RD		RD		
Diferenciação						RI		
Multifocalidade								
Encapsulamento					RI			
Invasão extratiroideana		RD		RD		RD		
Metástase ao diagnóstico						RD		RD

Abreviações: RD: relação direta entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. RI: relação inversa entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. Em vermelho, associação mostra-se desfavorável ao paciente.

Células do sistema imune, ativação do sistema imune e perfil inflamatório

Macrófagos foram encontrados mais frequentemente em tecidos que também expressaram COX-2, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 e CD134 (todos $p < 0,05$). Linfócitos T foram encontrados mais frequentemente em tecidos que expressaram IL-1 β , IL-6, IL-10 e CD134 (todos $p < 0,05$). Linfócitos T auxiliares infiltraram frequentemente tecidos que expressaram COX-2 ($p < 0,05$). Já linfócitos T citotóxicos foram mais frequentes em tecidos que expressaram COX-2, IL-1 β e IL-23 (todos $p < 0,05$). Linfócitos NK foram mais frequentes em tecidos que expressavam COX-2, IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-17A, CD134, IL-23 e ROR- γ T (todos $p < 0,05$). Linfócitos T de memória foram mais frequentes em tecidos positivos para IL-10 e IL-17A (ambos $p < 0,05$). Linfócitos GRANZIMA B+ infiltraram mais frequentemente tecidos que apresentaram expressão de IL-23, IL-6, IL-1 β e COX2. Linfócitos CD69+ foram mais frequentes em tecidos que expressaram IL-23, CD134, IL-6, IL-10, IL-1 β e COX2. Linfócitos CD25+ foram mais frequentes em tecidos que expressaram IL-6, IL-1 β e COX2. ROR- γ T se correlacionou com a ausência de expressão de IL-17A, ausência de IL-1 β e ausência de IL-23. A tabela 10 resume as correlações encontradas entre todos os marcadores estudados.

Tabela 10: Correlação entre os múltiplos marcadores estudados. Em cada uma das células vemos o valor de p correspondente a correlação entre as respectivas colunas e linhas

	ROR- γ T	IL-23	CD134	IL-6	IL-10	IL-1 β	COX2	IL-17A	Linfócitos CD25+	Linfócitos CD69+	Linfócitos GRANZIMA B+	Linfócitos T de memória	Linfócitos NK	Linfócitos T	Linfócitos B	Linfócitos T citotóxicos	Linfócitos T auxiliares	Macrófagos
Macrófagos		<0,001	0,002	<0,001	0,007	<0,001	0,008	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Linfócitos T auxiliares			0,055				0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
Linfócitos T citotóxicos		<0,001				0,04	0,019		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001			
Linfócitos B								0,072	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	<0,001				
Linfócitos T			0,003	0,011	0,018	0,028		0,084	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001					
Linfócitos NK	0,006	0,004	0,034	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	0,034	0,0083	<0,001	0,012	<0,001						
Linfócitos T de memória		0,086		0,066	0,048			0,003	<0,001	<0,001	0,032							
Linfócitos GRANZIMA B+		0,002	0,06	0,002	0,088	0,015	0,001		0,037	<0,001								
Linfócitos CD69+		0,002	<0,001	<0,001	0,046	<0,001	<0,001	0,098	<0,001									
Linfócitos CD25+		0,082	0,085	0,027		0,048	0,003											
IL-17A	0,007	0,01	0,035	0,007	0,01	0,002	0,01											
COX2		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001												
IL-1 β	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001													
IL-10		<0,001	<0,001	<0,001														
IL-6		<0,001	<0,001															
CD134		<0,001																
IL-23	0,044																	
ROR- γ T																		

Análise multivariada e análise de sobrevida

Como demonstrado, os diferentes marcadores estão estreitamente correlacionados entre si. Ainda, múltiplos marcadores estão correlacionados a diferentes variáveis clínicas e anatomopatológicas. Isso levanta a hipótese de que a associação de um marcador com variável clínica/anatomopatológica possa ser mascarada por um fator de confusão. Para prevenir tal equívoco, nós optamos por realizar uma análise multivariada, usando cada variável clínica ou anatomopatológica como variável dependente.

A tabela 11 resume os achados da análise de regressão logística múltipla. Tecidos malignos apresentaram mais frequentemente infiltração de linfócitos T e expressão de IL-1 β e CD134. Por sua vez, tecidos benignos apresentaram mais frequentemente infiltração por linfócitos T citotóxicos e expressão de IL-23.

A distribuição dos linfócitos T citotóxicos em tecidos benignos nos intrigou. Dentre os tecidos benignos, a infiltração de linfócitos T citotóxicos não foi correlacionada com a infiltração de linfócitos GRANZIMA B+ ($p=0,443$), linfócitos CD69+ ($p=0,234$) e linfócitos CD25+ ($p=0,058$). Já entre os tumores malignos, a infiltração de linfócitos T citotóxicos foi estreitamente correlacionada com a infiltração de linfócitos GRANZIMA B+ ($p<0,001$), linfócitos CD69+ ($p<0,001$) e linfócitos CD25+ ($p=0,001$).

Tumores multifocais apresentaram-se associados à infiltração por linfócitos T de memória. A presença de invasão extra-tiroideana foi associada à ausência de TLC concomitante, à presença de infiltração de linfócitos T e à ausência de infiltração de linfócitos T auxiliares. A presença de metástase ao diagnóstico foi associada à infiltração de linfócitos T, linfócitos auxiliares, macrófagos, linfócitos CD69+ e ausência de expressão de CD134.

A tabela 12 resume os achados da análise de regressão múltipla para as variáveis dependentes quantitativas. A maior idade ao diagnóstico foi associada à ausência de infiltração

de linfócitos T citotóxicos. O maior tamanho tumoral se associou à infiltração de linfócitos NK e ausência de infiltração de linfócitos de memória. Não houve associação significativa entre dose acumulada de radioiodoterapia e quaisquer variáveis imunológicas. A tabela 13 resume as associações independentes obtidas pela análise multivariada.

Tabela 11: Associações obtidas pela análise de regressão logística múltipla.

Variável Clínica ou anatomopatológica	Variável imunológica	Categoria	Valor de p	OR	95.0% IC – Inferior	95.0% IC - Superior
Chance de ser maligno	Linfócitos T citotóxicos	Ausência de infiltração	0,029	Ref.		
		1 a 10 células	0,033	0,294	0,095	0,908
		Mais de 10 células	0,253	3,567	0,402	31,613
	Linfócitos T	Ausência de infiltração	0,03	Ref.		
		1 a 10 células	0,998	783646281,1	0,000	.
		Mais de 10 células	0,008	10,067	1,819	55,716
	IL-1 β	Expressão	0,008	6,200	1,593	24,122
	CD134	Expressão	0,006	1,446	1,109	1,887
	IL23	Expressão	<0,001	0,570	0,410	0,792
Chance de ser multifocal	Linfócitos T de memória	Ausência de infiltração	0,004	Ref.		
		1 a 10 células	0,075	3,272	0,883	12,124
		Mais de 10 células	0,001	6,631	2,126	20,681
Chance de ter invasão extratiroideana	Tiroidite	Presença	0,003	0,134	0,034	0,518
	Linfócitos T auxiliares	Ausência de infiltração	0,017	Ref.		
		1 a 10 células	0,559	0,665	0,169	2,611
		Mais de 10 células	0,004	0,121	0,027	0,524
	Linfócitos T	Ausência de infiltração	0,001	Ref.		
		1 a 10 células	0,215	2,366	0,604	9,258
		Mais de 10 células	<0,001	13,903	3,415	56,594

Tabela 11: Continuação.

Variável Clínica ou anatomopatológica	Variável imunológica	Categoria	Valor de p	OR	95.0% IC – Inferior	95.0% IC - Superior
Chance de ter metástase ao diagnóstico	Macrófagos	Ausência de infiltração	0,008	Ref.		
		1 a 10 células	0,279	0,439	0,099	1,949
		Mais de 10 células	0,041	5,023	1,063	23,720
	Linfócitos CD69+	Ausência de infiltração	<0,001	Ref.		
		1 a 10 células	<0,001	23,270	4,591	117,933
		Mais de 10 células	0,541	1,626	0,341	7,744
	CD134	Expressão	0,01	0,059	0,007	0,513
	Linfócitos T	Ausência de infiltração	0,048	Ref.		
		1 a 10 células	0,125	3,729	0,692	20,094
		Mais de 10 células	0,014	7,476	1,481	37,726
	Linfócitos T auxiliares	Ausência de infiltração	0,014			
		1 a 10 células	0,025	6,949	1,274	37,897
		Mais de 10 células	0,070	0,257	0,059	1,121

Abreviações: OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança.

Nota: (a) O valor arbitrariamente grande reflete, juntamente com o grande intervalo de confiança, a baixa precisão e a não significância desta aferição.

Tabela 12: Associações obtidas pela análise de regressão linear múltipla.

Variável Clínica ou anatomopatológica	Variável imunológica	Valor de p	OR	95.0% IC - Superior	95.0% IC - Inferior
Maior idade ao diagnóstico	Infiltração de Linfócitos T citotóxicos	0.019	0.010	0.000	0.463
Maior tamanho tumoral	Infiltração de Linfócitos NK	0.002	5.740	1.884	17.482
	Infiltração de Linfócitos T de memória	0.004	0.453	0.268	0.766

Abreviações: OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança.

Tabela 13: Resumo das associações obtidas pela análise multivariada.

Variável clínica e anatomopatológica	Células do sistema imune								Células do sistema imune ativadas			Perfil inflamatório do tumor							
	Linfócitos T	Linfócitos T auxiliares	Linfócitos T citotóxicos	Linfócitos B	Linfócitos NK	Linfócitos Treg	Macrófagos	Linfócitos T de memória	Linfócitos GRANZIMA B+	Linfócitos CD69+	Linfócitos CD25+	COX2	CD134	IL-10	IL-23	IL-6	IL-1β	IL-17	ROR-γT
Mais frequente em tumores malignos	RD		RI										RD		RI		RD		
Idado ao diagnóstico			RI																
Tamanho tumoral					RD			RI											
Dose acumulada de radioiodoterapia																			
Diferenciação																			
Multifocalidade								RD											
Encapsulamento																			
Invasão extratiroideana	RD	RI																	
Metástase ao diagnóstico	RD	RD					RD			RD			RI						

Abreviações: RD: relação direta entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. RI: relação inversa entre a infiltração celular a variável clínica ou anatomopatológica. Em azul, associação mostra-se favorável ao paciente. Em vermelho, associação mostra-se desfavorável ao paciente.

Investigamos quais variáveis teriam impacto na sobrevida livre de recidiva dos pacientes com câncer de tireoide. Pacientes com câncer de tireoide foram classificados como livres de doença em 207 casos (77,82%), e com recorrência em 59 casos (22,18%, incluindo 9 mortos pela doença). Trinta e nove pacientes não puderam ser classificados em qualquer um desses dois grupos e foram posteriormente excluídos de qualquer análise envolvendo prognóstico. O teste de log-rank foi feito para cada uma das variáveis, tanto clínicas/anatomopatológicas quanto imunológicas, buscando aquelas que poderiam diferenciar pacientes que teriam menor tempo livre de recidiva. Pacientes com tumores pouco diferenciados ($p=0,011$), diagnosticados em estágios avançados da doença ($p=0,028$), com metástase linfonodal ao diagnóstico ($p=0,009$) apresentaram menor tempo livre de recidiva. Ainda, pacientes cujos tumores apresentavam mais que 10 linfócitos T citotóxicos ($p=0,001$) e expressão de COX2 ($p=0,010$) apresentaram menor tempo livre de recidiva. Os resultados da análise univariada encontram-se resumidos na tabela 14 a 16 e as curvas de Kaplan-Meier demonstram visualmente as diferenças de padrões de prognóstico destes pacientes.

Tabela 14: Análise univariada comparando a sobrevida livre de doença entre pacientes com diferentes características clínicas e anatomopatológicas.

Classificação da variável	Variável	Categoria	SLR (5 anos)	Valor de p (log-rank)
Clínicas e anatomopatológicas	Gênero	Feminino	0,669	0,282
		Masculino	0,767	
	Idade	<=45 anos	0,629	0,211
		>45 anos	0,760	
	Tipo histológico	Papilífero Clássico	0,610	0,011
		Variante Folicular	0,916	
		Pouco diferenciado	0,429	
		Carcinoma Folicular	0,623	
	Multifocalidade	Unifocal	0,681	0,259
		Multifocal	0,719	
	Cápsula	Ausente	0,855	0,369
		Presente	0,843	
	Invasão extratiroideana	Ausente	0,661	0,875
		Presente	0,686	
	Tiroidite concomitante	Ausente	0,730	0,304
		Presente	0,594	
	Tamanho tumoral	até 2 cm	0,754	0,435
		entre 2 e 4 cm	0,602	
		maior que 4 cm	0,733	
	pTNM	I	0,736	0,028
		II	0,778	
		III	0,813	
		IV	0,333	
	Metástase ao diagnóstico	Ausente	0,797	0,009
		Presente	0,565	

Abreviações: SLR: sobrevida livre de recidiva.

Tabela 15: Análise univariada comparando a sobrevida livre de recidiva entre pacientes cujos tumores apresentaram diferentes perfis de infiltração linfocitária.

Classificação da variável	Variável	Categoria	SLR (5 anos)	Valor de p (log-rank)
Fenótipo do infiltrado inflamatório	Macrófagos	Ausência de células	0,610	0,233
		Até 10 células	0,698	
		Mais que 10 células	0,752	
	Linfócitos T	Ausência de células	0,663	0,975
		Até 10 células	0,725	
		Mais que 10 células	0,665	
	Linfócitos T auxiliares	Ausência de células	0,762	0,224
		Até 10 células	0,578	
		Mais que 10 células	0,583	
	Linfócitos T citotóxicos	Ausência de células	0,788	0,001
		Até 10 células	0,718	
		Mais que 10 células	0,450	
	Linfócitos B	Ausência de células	0,708	0,706
		Até 10 células	0,500	
		Mais que 10 células	0,641	
	Linfócitos NK	Ausência de células	0,667	0,383
		Até 10 células	0,844	
		Mais que 10 células	0,667	
	Linfócitos T de memória	Ausência de células	0,644	0,579
		Até 10 células	0,784	
		Mais que 10 células	0,683	
	Linfócitos Treg	Ausência de células	0,814	0,374
		Mais que 10 células	1,000	

Abreviações: SLR: sobrevida livre de recidiva.

Tabela 16: Análise univariada comparando a sobrevida livre de recidiva entre pacientes cujos tumores apresentaram infiltrado inflamatório ativado ou não e com diferentes perfis de microambiente tumoral.

Classificação da variável	Variável	Categoria	SLR (5 anos)	Valor de p (log-rank)
Ativação do infiltrado inflamatório	Linfócitos GRANZIMA B+	Ausência de células	0,734	0,433
		Até 10 células	0,662	
		Mais que 10 células	0,278	
	Linfócitos CD69+	Ausência de células	0,739	0,507
		Até 10 células	0,680	
		Mais que 10 células	0,647	
	Linfócitos CD25+	Ausência de células	0,686	0,953
		Até 10 células	0,656	
		Mais que 10 células	0,583	
Características do microambiente	COX2	Negativo	0,848	0,010
		Positivo	0,586	
	IL-17A	Negativo	0,676	0,583
		Positivo	0,775	
	IL-1 β	Negativo	0,716	0,426
		Positivo	0,682	
	IL-10	Negativo	0,656	0,669
		Positivo	0,710	
	IL-6	Negativo	0,742	0,687
		Positivo	0,723	
	CD134	Negativo	0,656	0,184
		Positivo	0,734	
	IL-23	Negativo	0,658	0,735
		Positivo	0,709	

Abreviações: SLR: sobrevida livre de recidiva.

Uma vez que diversas variáveis se associaram ao prognóstico dos pacientes estudados, foi feito um modelo de análise de sobrevida multivariado de Cox. Para isso, foram excluídos pacientes dos quais não obtivemos informações clínicas completas, pacientes cujos tecidos não encontravam-se disponíveis para todos os marcadores, bem como pacientes cujo desfecho clínico não foi possível de ser acessado. No final, 104 pacientes foram considerados elegíveis para a análise de sobrevida multivariada. Seleccionamos para entrada no modelo as variáveis que influenciaram na sobrevida dos pacientes com valor de p menor que 0,2. A sequência de inserção das variáveis no modelo se deu tendo como critério o menor valor de p. O modelo múltiplo mostrou que tanto a infiltração de mais que 10 linfócitos T citotóxicos quanto a expressão de COX2 foram bons preditores do prognóstico dos pacientes estudados. Entretanto, a inserção de COX2 ajustou o efeito da infiltração de linfócitos T citotóxicos. Isso nos sugere que ambas as variáveis interagiriam de alguma forma. Por isso, visando a melhor modelagem do prognóstico dos pacientes, estudamos uma terceira variável (chamada de fator imunológico) cruzando os dados tanto da infiltração de linfócitos T citotóxicos quanto da expressão de COX2. Juntamos os pacientes que não apresentavam infiltração de Linfócitos T citotóxicos com aqueles que apresentavam até 10 células em áreas tumorais, obtendo a distribuição mostrada na tabela 17.

Tabela 17: Variável imunológica obtida a partir da infiltração de linfócitos T citotóxicos e expressão tumoral de COX2.

Categorias	N	%
Até 10 Linf T Citotóxicos / COX2 (-)	37	35,6
Mais que 10 Linf T Citotóxicos / COX2 (-)	7	6,7
Até 10 Linf T Citotóxicos / COX2 (+)	42	40,4
Mais que 10 Linf T Citotóxicos / COX2 (+)	18	17,3
Total	104	100

Ajustando as variáveis para todos os preditores de prognóstico, o modelo multivariado de Cox mostrou que a variável imunológica devido à infiltração de mais de 10 linfócitos T citotóxicos juntamente com a expressão de COX2 foi um preditor independente do prognóstico dos pacientes (tabela 18 e figura 7). Surpreendentemente, o fator imunológico, quando inserido no mesmo modelo, retirou a significância da presença da metástase ao diagnóstico.

O padrão das curvas de Kaplan-meier (Figura 7) sugerem que o fator imunológico propicia melhor diferenciação da evolução clínica dos pacientes com câncer de tireoide se comparado ao estadiamento pTNM. Para averiguar esta possibilidade, testamos a capacidade de prever o desfecho clínico tanto do pTNM quanto do fator imunológico por meio de curvas ROC. O fator imunológico mostrou maior área sob a curva do que o pTNM e, portanto, maior acurácia (Figura 8).

Atribuímos a cada categoria da variável imunológica um score equivalente ao seu valor de Hazard Ratio (HR). Ainda, atribuímos para cada categoria do pTNM um score equivalente ao seu valor de HR. Com isso obtivemos uma terceira variável, chamada “Score ImunopTNM”, definida como a soma dos dois últimos scores (Tabela 19). Isso propiciou-nos obter um preditor de prognóstico que levasse em conta tanto as características imunológicas quanto as características clínico-patológicas. De fato, o Score ImunopTNM foi melhor preditor de prognóstico que ambos isoladamente, como mostrado na Tabela 20 e figura 8.

Tabela 18: Modelo de Cox para análise multivariada de sobrevida.

Variável imunológica	Categoria	Valor de p	HR	95.0% IC – Inferior	95.0% IC - Superior
Interação Linfócitos T citotóxicos / Expressão de COX2	Até 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(-)	0,021	Ref		
	Mais que 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(-)	0,024	7,476	1,296	43,107
	Até 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(+)	0,028	4,195	1,163	15,128
	Mais que 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(+)	0,002	8,160	2,138	31,133
Tiroidite	Presença	0,473	1,371	0,579	3,243
Tipo histológico	Carcinoma Folicular	0,094	Ref		
	Carcinoma Papilífero Clássico	0,521	1,468	0,454	4,743
	Carcinoma Papilífero Variante Folicular	0,118	0,296	0,064	1,364
	Carcinoma Pouco Diferenciado	0,719	1,313	0,296	5,817
Metástase LN ao diagnóstico	Presença	0,204	1,704	0,747	3,885

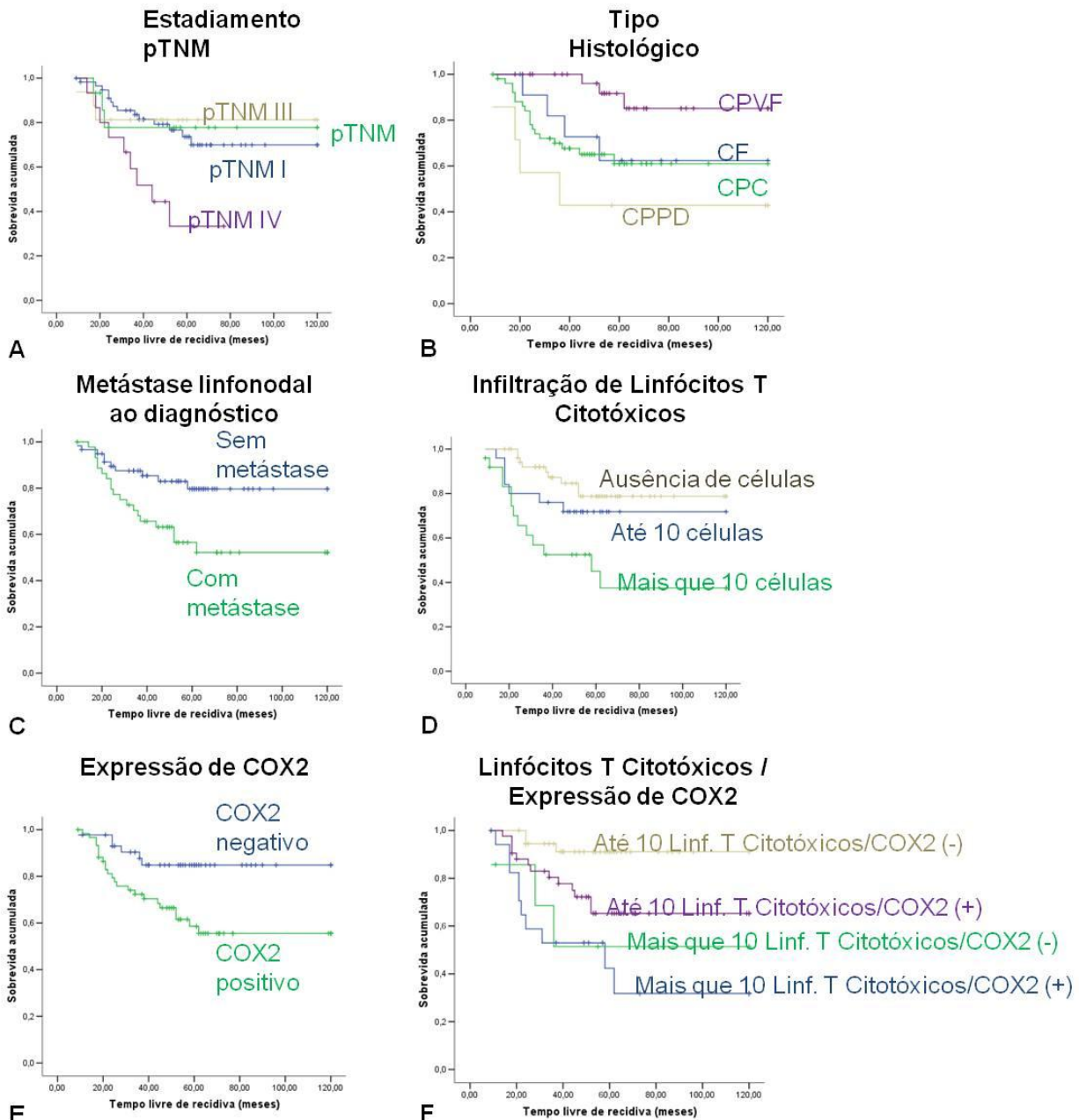


Figura 7: Curvas de Kaplan-Meier mostrando diferentes padrões de prognóstico conforme as variáveis estudadas. (A) Pacientes diagnosticados em estágios mais avançados da doença, sobretudo em estágios IV, possuem pior evolução clínica. (B) Da mesma forma, pacientes cujos tumores foram pouco diferenciados (CPPD) tinham pior prognóstico se comparado a pacientes diagnosticados com Carcinoma Papilífero Clássico (CPC), Carcinoma Papilífero Variante Folicular (CPVF) e Carcinoma Folicular (CF). (C) Pacientes que ao diagnóstico apresentavam metástase linfonodal tiveram pior evolução clínica. (D) Pacientes que apresentavam mais que 10

Linfócitos T Citotóxicos apresentaram pior prognóstico, com menor tempo livre de recidiva associado. (E) Pacientes cujos tumores expressaram COX2 tinham menor tempo livre de recidiva. (F) A análise multivariada mostrou que o fator imunológico advindo da infiltração de linfócitos T citotóxicos e expressão de COX2 é um preditor independente do prognóstico dos pacientes com câncer de tireoide.

Tabela 19: Valores de HR e respectivos scores de cada categoria.

Variável	Categoria	Valor de HR	Score
pTNM	I	1,000	1
	II	0,914	1
	III	0,867	1
	IV	3,033	3
Risco conforme ATA	Baixo risco	1,000	1
	Risco intermediário	1,128	1
	Alto risco	3,491	3
Fator imunológico	Até 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(-)	1,000	1
	Mais que 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(-)	7,476	7
	Até 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(+)	4,195	4
	Mais que 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(+)	8,160	8

Tabela 20: Comparação entre os preditores de prognóstico. Usamos a área sob a curva como estimador da acurácia.

Variável preditora do prognóstico	Área sob a curva	Valor de p ^a
pTNM	0.615	0,069
Linfócito T citotóxico/COX2	0.729	<0,001
Score ImunopTNM	0.769	<0,001
Score ATA	0.646	0,020
Score ImunoATA	0.774	<0,001

Nota: (a) Valor de p relativo ao teste da hipótese nula de a área sob a curva ser igual a 0,5.

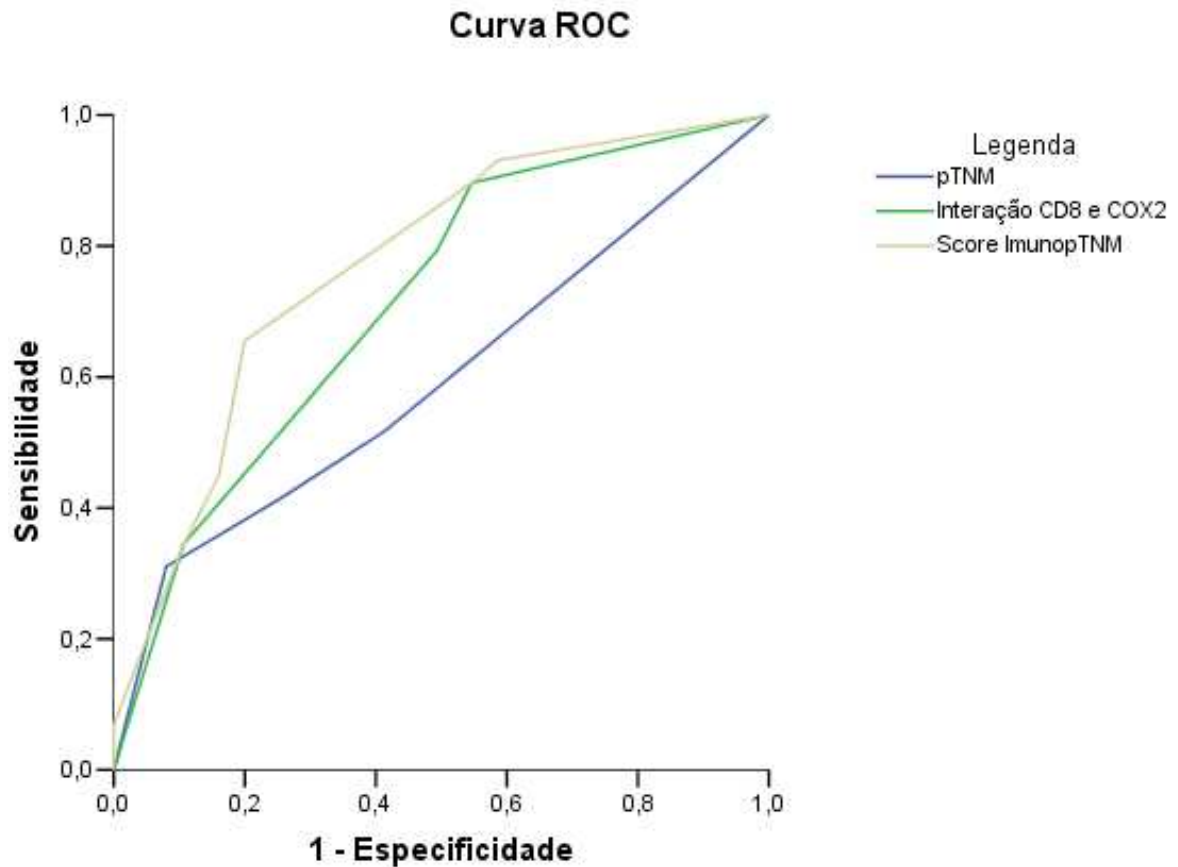


Figura 8: Curva ROC mostrando que o Score Final (definido como a soma dos scores do pTNM e os scores do fator imunológico) é melhor marcador de prognóstico do que o pTNM sozinho e do que o fator imunológico sozinho.

Observamos também que a variável imunológica foi um preditor de prognóstico independente do risco atribuído pelos atuais Guidelines da American Thyroid Association, que preconiza a estratificação dos pacientes em “Baixo risco”, “Risco intermediário” e “Alto risco”. A tabela 21 mostra os diferentes valores de HR obtidos na análise multivariada. Da mesma forma como procedemos com o estadiamento pTNM, atribuímos um Score a cada categoria de risco definido como sendo igual ao valor de HR obtido na análise univariada. Em seguida, somamos o score do risco conforme a ATA com o score do fator imunológico, de forma a obtermos uma

variável que leve em consideração tanto o fator imunológico quanto os critérios de risco estabelecidos pela ATA. A esta nova variável, chamamos de Score ImunoATA. Com este Score em mãos, comparamos quais seriam os melhores preditores de prognóstico. De fato, a figura 9 mostra que o preditor que apresenta melhor acurácia é o Score ImunoATA. De todos os marcadores prognósticos presentes neste estudo, o Score ImunoATA foi o que obteve maior sucesso estatístico na predição do prognóstico dos pacientes estudados (Tabela 20).

Tabela 21: Análise multivariada comparando o fator imunológico com tiroidite concomitante e a estratificação de risco proposta pela American Thyroid Association (ATA).

Variável imunológica	Categoria	Valor de p	HR	95.0% IC – Inferior	95.0% IC - Superior
Interação Linfócitos T citóxicos / Expressão de COX2	Até 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(-)	0,008			
	Mais que 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(-)	0,009	9,352	1,745	50,13
	Até 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(+)	0,026	4,377	1,194	16,042
	Mais que 10 linfócitos T citotóxicos/COX2(+)	0,001	8,859	2,407	32,609
Tiroidite	Presença	0,35	1,512	0,634	3,605
Risco conforme a ATA	Baixo risco	0,009			
	Risco intermediário	0,668	0,804	0,298	2,173
	Alto risco	0,026	2,95	1,137	7,654

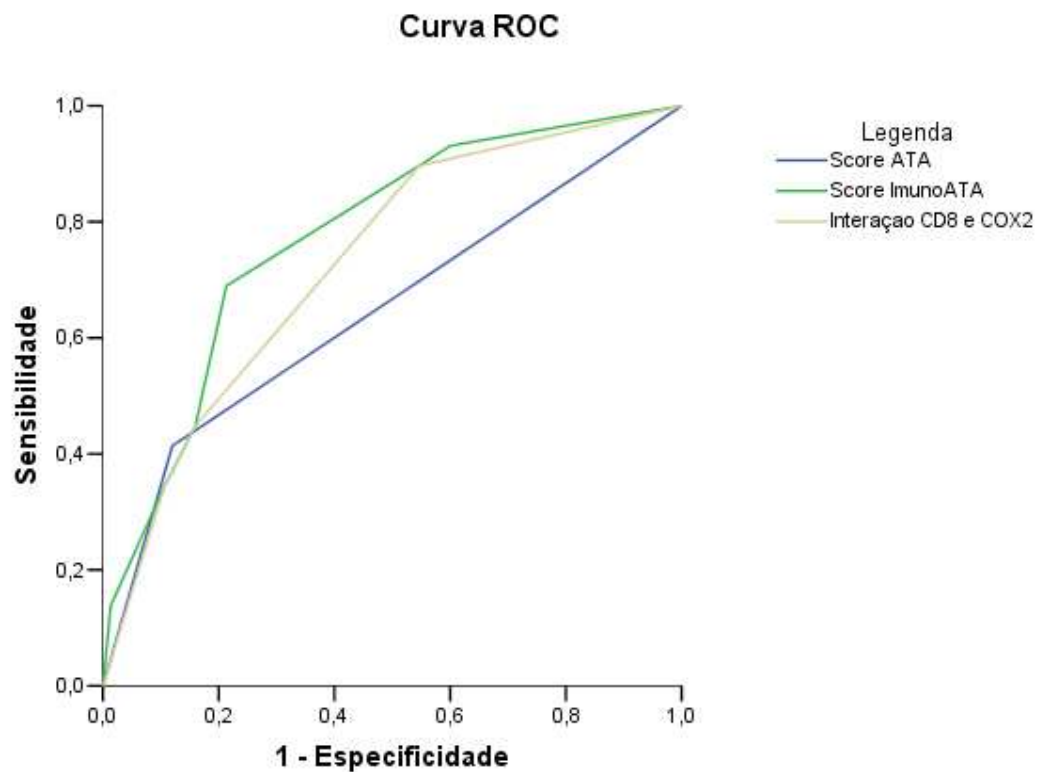


Figura 9: Curva ROC mostrando que o score obtido pelo fator imunológico aliado aos critérios de risco da ATA possuem melhor acurácia na predição do prognóstico dos pacientes estudados se comparados às duas variáveis isoladas.

Estudo do microambiente inflamatório na metástase

Comparamos a densidade das células imunológicas em 25 tumores primários e respectivas metástases linfonodais. Notamos um aumento da densidade de linfócitos GRANZIMA B+ nas metástases linfonodais ($p < 0,001$; Figura 10). As demais células não apresentaram densidades significativamente diferentes nos 2 tecidos.

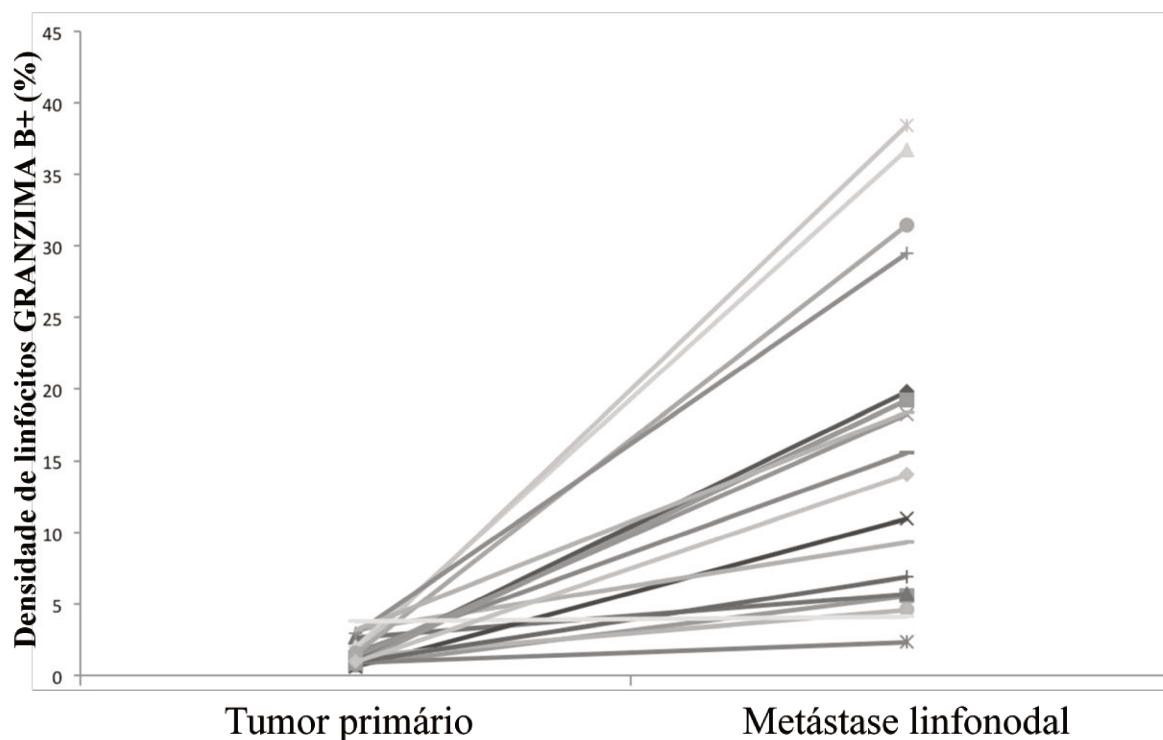


Figura 10: Gráfico de pontos pareados mostrando aumento expressivo da densidade de linfócitos GRANZIMA B+ em metástases linfonodais de pacientes com câncer de tireoide.

Comparamos também a expressão de proteínas inflamatórias em células tumorais no tumor primário e em células tumorais de metástases. Tecidos metastáticos apresentam menor expressão de COX2 ($p = 0,002$) e de IL-10 ($p = 0,005$; figuras 11 e 12, respectivamente). Todos os demais marcadores não apresentaram diferenças significativas de expressão em tumores primários e tecidos metastáticos.

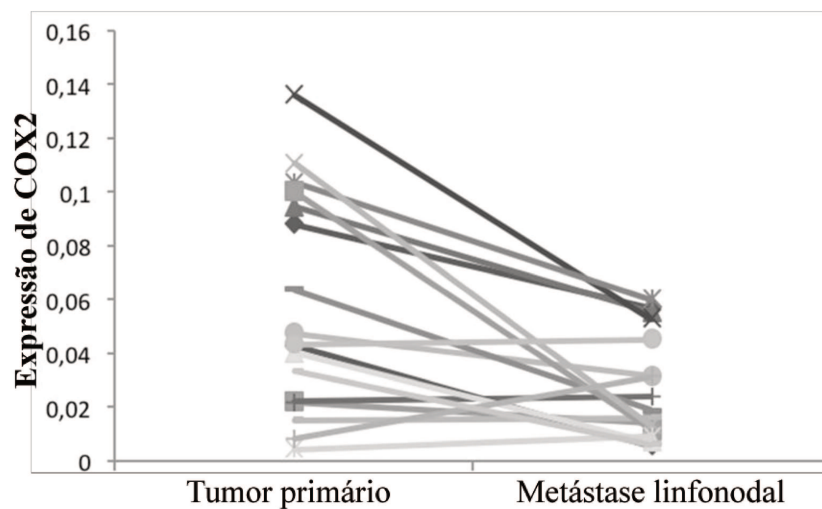


Figura 11: Gráfico de pontos pareados mostrando diminuição expressiva de COX2 em tecidos metastáticos.

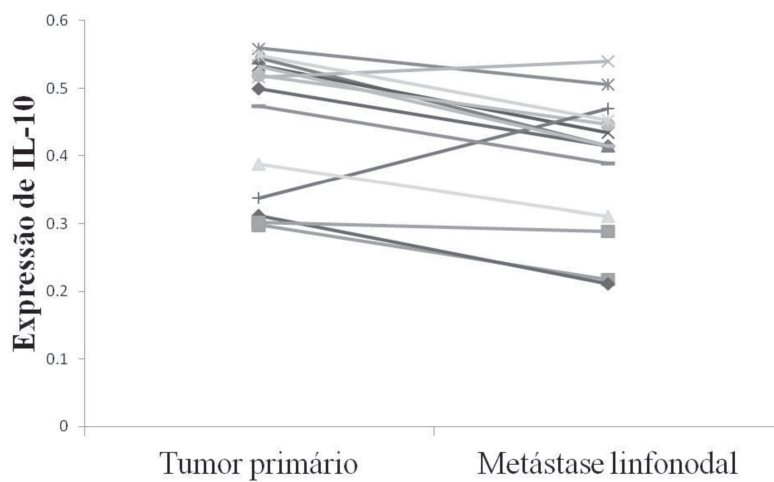


Figura 12: Gráfico de pontos pareados mostrando diminuição da expressão de IL-10 em tecidos de linfonodos metastáticos.

A particularidade imunológica dos cânceres pediátricos

Dentre os pacientes incluídos, 46 (36 do sexo feminino e 10 do masculino) apresentavam 20 anos ou menos, caracterizando a faixa etária pediátrica. Apresentavam média de idade ao diagnóstico de $15,5 \pm 4,33$ anos. Destes casos, 68,2% apresentavam carcinoma papilífero clássico; 18,2%, carcinoma papilífero variante folicular; 2,3% carcinoma papilífero pouco diferenciado e 11,4%, carcinoma folicular. Cerca de metade (48,8%) apresentavam tumores multifocais; 75% não apresentava encapsulamento tumoral; 46,3% apresentava invasão extratiroideana e apenas 13,3% apresentava TLC concomitante. Comparando a apresentação inicial de pacientes pediátricos versus não pediátricos, observamos que pacientes da faixa etária pediátrica mais frequentemente apresentam-se com metástase ao diagnóstico (73,3%) em relação aos pacientes adultos (33,9%; $p < 0,001$). Não observamos diferença entre os grupos no tocante às outras variáveis clínicas e anatomopatológicas. A análise de sobrevida não mostrou diferença de tempo livre de recidiva entre os dois grupos ($p = 0,522$; Figura 13). Na figura 13, algo nos chamou atenção. Vale notar que a partir de por volta do centésimo mês de seguimento clínico, a curva dos pacientes pediátricos se mantém estável enquanto que a curva dos pacientes não pediátricos continua a cair. Isso nos sugere que, dentro o grupo de pacientes não pediátricos, as recidivas se tornam mais frequentes ao longo do tempo, enquanto que, no grupo de pacientes pediátricos, estas se mantêm estáveis e os pacientes se mantêm com doença controlada. Esta importante diferença clínica nos evoca a ideia de que provavelmente estes pacientes exibam características imunológicas que os distiguem.

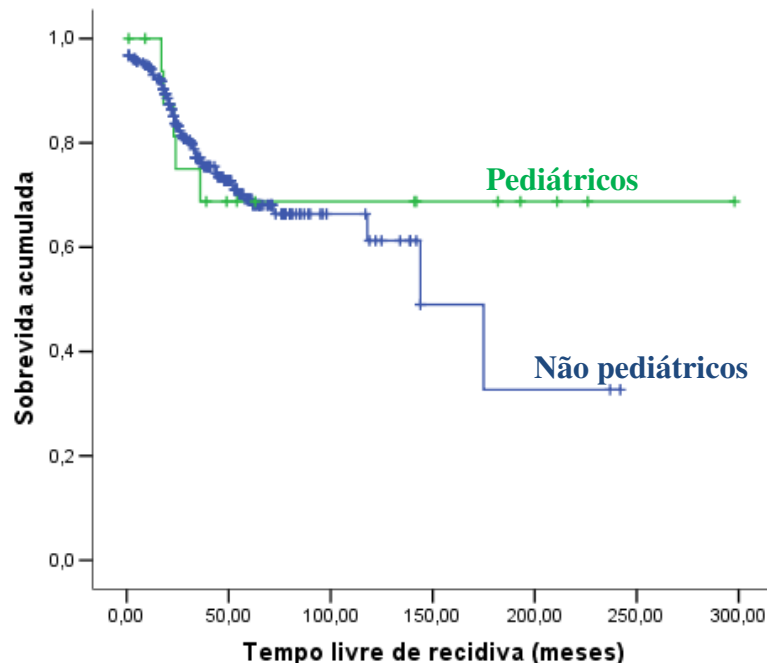


Figura 13: Curvas de Kaplan-Meier mostrando que pacientes pediátricos, apesar de uma apresentação inicial mais agressiva com metástases ao diagnóstico, apresentam evolução clínica similar aos pacientes não pediátricos.

Para procurar tais diferenças, estudamos as distintas variáveis imunológicas comparando-as entre os grupos pediátrico versus não-pediátrico. Dentre o grupo pediátrico, 17 dispunham de tecido para as análises imunológicas. A pouca quantidade de amostras nos encorajou a olhar para estes dados com uma abordagem mais qualitativa do que propriamente quantitativa. A expressão de CD134 foi observada em 94,6% dos tumores de pacientes não pediátricos, enquanto que apenas 77,8% dos tumores de pacientes pediátricos apresentaram expressão de CD134 ($p=0,046$). Todos os tumores pediátricos analisados apresentaram infiltração de linfócitos T citotóxicos (em 40% destes casos observamos infiltração de mais de 10 linfócitos T citotóxicos) enquanto que 51,2% dos tumores não-pediátricos apresentaram infiltração destes linfócitos ($p=0,004$). A infiltração de linfócitos T citotóxicos se correlacionou positivamente com a

infiltração de linfócitos CD69+ ($P=0,011$), mas não com a infiltração de linfócitos GRANZIMA B+ ($p=0,635$) e linfócitos CD25+ ($p=0,073$).

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que infiltrações intra-tumorais por diferentes células do sistema imunológico estão associadas a diferentes características clínicas e anatomopatológicas, sendo algumas de maior agressividade tumoral enquanto outras são de menor agressividade tumoral. De fato, a literatura tem sugerido que o papel do sistema imunológico na progressão de tumores é bastante complexo e dependeria de uma cadeia pleiotrópica de eventos fisiopatológicos (120). Assim, o quanto uma célula imunológica é determinante para uma dada característica clínica depende de diversas interações com o microambiente e com o organismo hospedeiro, o que dificulta sua interpretação fisiopatológica.

Neste estudo, encontramos que a infiltração de macrófagos foi mais frequente em tumores malignos, em pacientes jovens e nos que se apresentavam com metástase ao diagnóstico. Por sua vez, a infiltração de linfócitos NK foi mais frequente em tumores malignos, em pacientes jovens, com tumores grandes, não encapsulados e submetidos a altas doses de terapia ablativa. Tanto macrófagos quanto linfócitos NK são componentes da chamada resposta imunológica inata, que é responsável pelo reconhecimento inicial de agentes agressores, além de ser um importante componente efetor da resposta imunológica adaptativa (121).

Células tumorais podem recrutar monócitos da circulação. Dentro do tecido tumoral, monócitos podem se diferenciar em macrófagos. Macrófagos são fenotipicamente reconhecidos pela expressão de CD68. Funcionalmente, os macrófagos são classificados em duas diferentes linhagens: M1 (promotora de fagocitose) e M2 (promotora de imunossupressão) (122, 123). Herrmann e colaboradores observaram que 75 carcinomas de tireoide de origem de célula folicular apresentaram elevados níveis de macrófagos associados a desdiferenciação tumoral. Os

autores demonstraram uma correlação positiva entre a infiltração de macrófagos e a infiltração de linfócitos T e linfócitos T de memória, bem como uma correlação positiva entre a infiltração dessas células e a densidade vascular intratumoral. Este achado era esperado uma vez que a interação entre macrófagos e linfócitos T leva a produção de fatores angiogênicos que promovem a vascularização tumoral (124). Este dado poderia explicar a correlação entre a infiltração de macrófagos e a presença de metástase ao diagnóstico mostrada nos nossos resultados.

Ryder e colaboradores estudaram a infiltração de macrófagos em tecidos de carcinomas bem diferenciados, pouco diferenciados e anaplásicos da tiroide, correlacionando a densidade de macrófagos com características clínicas e anatomopatológicas. No total, 27% dos carcinomas bem diferenciados da tiroide, 54% dos carcinomas pouco diferenciados e 95% dos carcinomas anaplásicos apresentaram infiltração de macrófagos. Entre os carcinomas pouco diferenciados, os autores demonstraram associação entre a infiltração de macrófagos e presença de invasão capsular, extensão extratiroideana e diminuição de sobrevida (93). Estudos com modelos animais sugerem que a progressão do câncer de tiroide seja acompanhada por importante infiltração de macrófagos da linhagem M2, de forma que a depleção destes macrófagos possa inclusive induzir a regressão tumoral. Estes autores sugeriram que a progressão do carcinoma papilífero mediada por macrófagos M2 poderia ser uma importante ferramenta terapêutica no tratamento de tumores não responsivos à terapêutica atual (125).

Funcionalmente, linfócitos NK produzem diversas citocinas como fator de necrose tumoral alfa, interferon- γ e fator estimulador de colônia (GM-CSF) (126). Recentemente, tem-se olhado para os linfócitos NK não apenas como uma célula promotora de citólise, mas, ao contrário, como uma célula capaz de afetar o funcionamento de diversas outras células, como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, bem como exercer uma função regulatória na

apresentação antigênica mediada por linfócitos T e B (126). Gogali e colaboradores investigaram a infiltração de linfócitos NK em 65 pacientes com carcinoma papilífero e em 25 pacientes com bócio nodular. Assim como nos nossos resultados, eles mostraram que linfócitos NK foram mais frequentemente encontrados em tecidos de carcinoma papilífero se comparado a tecidos de bócio nodular. Ainda, tumores malignos em estágios avançados tinham menos linfócitos NK do que tumores diagnosticados em estágios iniciais, sugerindo que a resposta imunológica inata teria pouca força na contenção da progressão tumoral (127).

Os linfócitos NK podem ser subdivididos em duas linhagens, de acordo com a expressão de CD56. Células CD56dim são células citotóxicas, enquanto que células CD56bright desempenham uma função regulatória (128). Essas duas linhagens apresentam diferentes potenciais de produção de citocinas, de resposta a citocinas e de citototoxicidade (129, 130). Liapi e colaboradores estudaram a presença destas duas linhagens em sangue e em tecido de pacientes com carcinoma papilífero e com bócio nodular, comparando com doadores saudáveis. Eles não observaram diferenças entre a quantidade das duas subpopulações no sangue dos três grupos estudados. Linfócitos NK citotóxicos foram mais encontrados no microambiente do bócio nodular se comparado ao carcinoma papilífero. Já linfócitos NK imunoregulatórios foram mais encontrados no microambiente do carcinoma papilífero se comparado a bócios nodulares, sugerindo que o padrão imunoregulatório de linfócitos NK esteja envolvido na carcinogênese tiroideana (128). Neste trabalho, os autores também mostraram que a infiltração de linfócitos NK citotóxicos foi positivamente correlacionada com o estadiamento tumoral. Em contraste, a infiltração de linfócitos NK imunoregulatórios foi negativamente correlacionada ao estadiamento tumoral. Os autores sugeriram que o microambiente tumoral seria, então, o local onde células imunoregulatórias imaturas se diferenciariam em células citotóxicas maduras. Entretanto, este

programa de diferenciação não seria funcionalmente completo e os linfócitos NK seriam “reeducados” por fatores próprios do microambiente tumoral, explicando o porquê de a infiltração de linfócitos NK poderia se associar a características favoráveis e desfavoráveis (128).

Mesmo sendo incapazes de eliminar células tumorais, as células da imunidade inata medeiam a ativação da chamada imunidade adaptativa (131). Esta é reconhecida por apresentar mecanismos efetores mais específicos e com efeitos a longo prazo num processo denominado “memória imunológica”, por meio do qual o organismo se torna protegido contra re-infecções do mesmo patógeno (131). Como a imunidade adaptativa poderia, então, influenciar na patogênese do câncer?

Esta pergunta também nos intrigou. De fato, nossos resultados mostraram que os diferentes linfócitos que expressam a resposta imunológica adaptativa estão associados a diversas características clínicas e anatomopatológicas. Observamos correlação entre os múltiplos marcadores estudados quando comparados entre si. Dessa forma, a infiltração de uma determinada célula do sistema imunológico (exemplo: linfócitos T auxiliares) foi mais frequente em tecidos que também apresentavam outro tipo de célula do sistema imunológico (exemplo: linfócitos T citotóxicos). Isso sugere que tumores de tireoide sejam infiltrado por um misto complexo de células do sistema imunológico. Ainda, provavelmente as células imunológicas se relacionem com um perfil de microambiente inflamatório caracterizado pela produção de diversas citocinas, como IL-1 β e IL-10, como sugerido pela literatura (132). A compreensão, então, da associação entre variáveis imunológicas e características clínicas se faz melhor quando feita a partir de uma análise multivariada, que leva em conta todos os diferentes marcadores conjuntamente em ajuste.

Tumores malignos apresentaram-se enriquecidos com linfócitos T e mais frequentemente expressaram CD134 e IL-1 β . Já os tecidos benignos apresentaram-se enriquecidos com linfócitos T citotóxicos e expressaram IL-23. Interessantemente, nos tecidos benignos, a infiltração de linfócitos T citotóxicos não se correlacionou com a infiltração de linfócitos ativados. Já nos tecidos malignos, foi notada uma estreita correlação entre a infiltração de linfócitos T citotóxicos e presença de linfócitos ativados, sugerindo que, por mais que estejamos olhando para a mesma célula tanto em tecidos malignos quanto tecidos não-malignos, estes linfócitos T citotóxicos apresentem padrões diferentes de ativação celular, sendo mais frequentemente ativados quando em tecidos malignos. Provavelmente, conforme a tumorigênese ocorre, sinais de exaustão imunológica e imunosenescência ganham espaço no microambiente tumoral, de forma que mesmo células ativadas não consigam ser efetivas na contenção da malignidade, como sugerido na literatura (133).

Nossos resultados mostraram que o tamanho tumoral foi associado positivamente à infiltração de linfócitos NK e negativamente à infiltração de linfócitos T de memória. Estes linfócitos também se associaram à presença de multifocalidade. A presença de invasão extratiroideana foi associada à infiltração por linfócitos T e à ausência de infiltração de linfócitos T auxiliares.

A presença de metástase ao diagnóstico foi mais frequente em pacientes cujos tumores apresentaram infiltração por macrófagos, linfócitos T, linfócitos T auxiliares e linfócitos CD69+ e que não apresentaram expressão de CD134. Particularmente, os tumores pediátricos apresentaram uma apresentação mais agressiva com frequentes casos com metástases ao diagnóstico. Estes tumores apresentavam-se enriquecidos por linfócitos T citotóxicos sobretudo correlacionados à presença de infiltração de linfócitos CD69+. CD69 é geralmente conhecido

como um marcador de superfície celular ativado precocemente em leucócitos. CD69 é expresso rápida e transitoriamente em leucócitos ativados mas não em leucócitos não ativados (134, 135). Estudos sugerem que a ativação leucocitária mediada por CD69 promova secreção de IL-2 e TNF- α , sugerindo que estas células disparem uma resposta pró-inflamatória (136, 137). Entretanto, Sancho e colaboradores mostraram que animais deficientes para CD69 desenvolvem uma forma exacerbada de artrite induzida por colágeno, com pronunciada resposta de linfócitos T e B contra o colágeno, acompanhada por níveis reduzidos de TGF- β em articulações inflamadas, sugerindo que CD69 também exerça uma função regulatória (138). Han e colaboradores mostraram que células CD69+ aumentam conforme ocorre a progressão tumoral. Estas células são hiporresponsivas e podem suprimir a proliferação celular de linfócitos T auxiliares por meio de TGF- β 1, contribuindo para o mecanismo de escape tumoral (139). Após isto, vários trabalhos sugeriram que a infiltração de linfócitos CD69+ pudesse estar associada à maior agressividade tumoral (133, 140-142). Assim, estes trabalhos ajudariam a explicar a associação entre linfócitos T citotóxicos e CD69 no que tange à agressividade inicial encontrada em pacientes pediátricos.

Observamos que pacientes pediátricos apresentavam mais frequentemente metástases ao diagnóstico. Ainda, observamos que tumores de pacientes pediátricos apresentam menor frequência de expressão de CD134, que em análise multivariada se associou à ausência de metástase ao diagnóstico. Fizemos, então uma análise de regressão logística univariada considerando a presença de metástase ao diagnóstico como variável dependente e a classificação pediátrico/não-pediátrico como variável independente. A análise mostrou uma correlação estreita entre as variáveis (OR=5,36; $p<0,001$). Em um segundo passo, fizemos uma análise de regressão logística multivariada considerando a presença de metástase ao diagnóstico como

variável dependente e a classificação pediátrico/não-pediátrico bem como a expressão de CD134 como variáveis independentes. A análise mostrou que tanto a classificação pediátrico/não-pediátrico ($p=0,999$), quanto a expressão de CD134 ($p=0,263$) perderam a significância. Isso nos sugere que a ausência de expressão de CD134 pudesse ser o mecanismo pelo qual tumores pediátricos se apresentariam frequentemente com metástases ao diagnóstico. É válido lembrar que o pouco número de pacientes diagnosticados com 20 anos ou menos dificulta análises mais precisas e acuradas do mecanismo envolvido na apresentação não usual destes pacientes.

A infiltração de linfócitos T citotóxicos juntamente com a expressão de COX2 foram marcadores independentes do prognóstico dos pacientes estudados. Ainda, mostramos que levar em conta estas duas variáveis imunológicas poderia ajudar o clínico a prever com maior acurácia o prognóstico dos pacientes com câncer de tireoide. Quando aliadas ao pTNM ou mesmo à estratificação de risco proposta pela ATA, as variáveis imunológicas teriam incremento de acurácia na predição do prognóstico. Vale lembrar que a imunoistoquímica é uma técnica relativamente barata e acessível e que, neste caso, poderia ter um impacto importante na prática clínica. Nossos trabalhos anteriores (110, 143) e de outros grupos (94, 96, 113) mostraram que a infiltração de células do sistema imunológico pode exercer uma reação anti-tumoral e um bom prognóstico foi associado à infiltração de linfócitos CD8+ e macrófagos (110). Entretanto, no presente estudo, diferentemente do anterior, adicionamos maior número de pacientes e estes com maior tempo de seguimento clínico. Quais seriam as explicações fisiopatológicas da correlação entre infiltração de linfócitos T citotóxicos/COX2 e pior prognóstico?

COX2 é uma enzima envolvida na produção de prostaglandinas. Ji e colaboradores demonstraram que a expressão de COX2 é maior em adenomas do que em tecidos tiroideanos normais. Esta descoberta sugere que a expressão de COX2 seja um evento precoce na progressão

de tumores tiroideanos (144). Cornetta e colaboradores estudaram a expressão de COX2 em 20 amostras de tecidos tiroideanos, incluindo tiroides normais, TLC e neoplasias tiroideanas. Os autores mostraram a expressão imunoistoquímica de COX2 em carcinomas papilíferos e foliculares, além de TLC, sugerindo que esta molécula pudesse ser uma possível ligação entre doenças nodulares e autoimunes (145). Esta relação poderia mascarar o efeito prognóstico de COX2, tendo na presença de TLC uma variável de confusão. Para prevenir este erro de interpretação, fizemos a análise de sobrevida multivariada usando a presença de TLC como variável de ajuste. De fato, COX2 manteve-se como marcador de prognóstico.

Ito e colaboradores estudaram a expressão de COX2 em carcinomas diferenciados e indiferenciados da tiroide. Eles observaram uma expressão reduzida de COX2 em casos de pacientes mais velhos, com tumores grandes, diagnosticados em estágio avançado da doença (146). Kajita e colaboradores, a partir de estudos in vitro, concluíram que COX2 teria um papel no crescimento de carcinomas papilíferos, uma vez que a inibição desta molécula regularia a proliferação celular (147). Scarpino e colaboradores estudaram o papel de COX2 em células de carcinomas papilíferos por meio da inibição específica desta enzima mediada por NS-398. Eles mostraram que o tratamento com inibidor de COX2 reduziu a migração e invasividade de células tumorais, sem alterar o crescimento (148). Estes resultados, então, forneceriam arcabouço fisiopatológico da associação entre expressão de COX2 e pior prognóstico.

A maioria dos estudos mostra um melhor prognóstico associado à infiltração de linfócitos T citotóxicos (87). Entretanto, Wakabayashi e colaboradores mostraram que pacientes com carcinoma pulmonar de não-pequenas células cujos tumores apresentaram grandes quantidade de linfócitos T citotóxicos apresentaram tempo de sobrevida mais curto (149). Segundo os autores, tumores com maior potencial de malignidade produziram citocinas e quimiocinas que, por sua

vez, recrutariam linfócitos para áreas intratumorais. Os linfócitos uma vez no microambiente intratumoral seriam, então, anergizados e não executariam sua função citotóxica (149). De fato, estudos têm sugerido que tumores apresentam alterações bioquímicas e metabólicas (150-153), vasculares (154, 155) e imunológicas (156-160) que tornam o microambiente tumoral hostil à infiltração e atividade protetora de células do sistema imunológico. Nossos dados, com o Modelo de Cox para análise multivariada de sobrevida, mostraram que 92% dos tumores que apresentaram mais que 10 linfócitos T citotóxicos, também apresentaram infiltração de linfócitos CD69+. Ainda, dos tumores que apresentavam mais que 10 linfócitos T citotóxicos, 68% não apresentaram infiltração de linfócitos GRANZIMA B+. Ou seja, por mais que estes tumores estejam enriquecidos com linfócitos T fenotipicamente caracterizados como citotóxicos, o microambiente tumoral encontra-se infiltrado por células que favorecem a progressão tumoral e pouco enriquecidos com células com atividade citotóxica. Este resultado reforça o conceito de que o quanto a resposta imunológica favorece ou desfavorece a progressão tumoral depende de um complexo balanço de interações entre tecido tumoral e organismo do hospedeiro, caracterizando um microambiente tumoral pró- ou anti-tumorigênico (161).

O Modelo de Cox para análise multivariada de sobrevida falhou em mostrar a presença de metástase linfonodal ao diagnóstico como marcador independente de prognóstico. Este resultado nos intrigou bastante e nos encorajou a estudar mais aprofundadamente a dinâmica da resposta imunológica no linfonodo metastático. Notamos um aumento da densidade de linfócitos GRANZIMA B+ nas metástases linfonodais, acompanhado de uma diminuição da expressão de COX2 e IL-10. Isto nos sugere que no microambiente da metástase linfonodal ocorreria um aumento de mecanismos efetores da resposta imunológica com importante infiltração de linfócitos ativados. Além disso, haveria na metástase linfonodal uma diminuição de mecanismos

de evasão tumoral, como a expressão de COX2 e IL-10. De fato, nossos resultados prévios sugerem que metástases linfonodais apresentam diminuição importante de expressão de B7H1, que é uma molécula co-inibitória envolvida na evasão tumoral (162).

French e colaboradores demonstraram que linfonodos metastáticos de pacientes com carcinoma papilífero apresentam alta densidade de linfócitos T $\text{IFN}\gamma$ +CD8+ (163). Eles sugeriram que a presença de metástase não detenha ou ainda promova a uma resposta imunológica suportada pela produção de $\text{IFN-}\gamma$. Embasando esta hipótese, os autores encontraram que linfonodos comprometidos com metástase apresentam linfócitos em atividade proliferativa. Este dado, juntamente com o nosso relatado acima, poderia explicar pelo menos em parte o porquê a metástase linfonodal não é um forte preditor de sobrevida ou progressão no câncer diferenciado de tireoide.

As principais limitações do nosso estudo são: trata-se de um estudo epidemiológico retrospectivo, que apresenta as dificuldades de coleta de dados clínicos e anatomopatológicos da totalidade de pacientes; poucos pacientes na população estudada pertenciam à faixa etária pediátrica, o que dificulta comparações melhores pareadas com a população não pediátrica; não fizemos estudos funcionais para avaliar se as propostas feitas a partir do estudo epidemiológico se sustentam em modelos biológicos.

Nosso estudo mostrou que o câncer diferenciado de tireoide é infiltrado por múltiplas células do sistema imunológico e que o padrão de infiltração celular parece se associar a características clínicas e anatomopatológicas distintas. Este misto celular infiltrativo, juntamente com a produção de citocinas inflamatórias, cria um perfil de microambiente que é importante na determinação da agressividade tumoral. De fato, a presença de linfócitos T citotóxicos e a expressão de COX2 puderam prever o pior prognóstico dos pacientes estudados. Ainda, o padrão

de resposta imunológica talvez nos ajude a entender paradigmas antigos da endocrinologia, como o melhor prognóstico em pacientes da faixa etária pediátrica ainda que estes se apresentem com uma doença mais agressiva. Outro paradigma potencialmente esclarecido é o do papel prognóstico da metástase linfonodal. Nosso estudo mostrou que a metástase linfonodal é o sítio onde ocorreria uma resposta imunológica mais efetora e menos evasiva, de forma a determinar de forma mais assertiva um ataque imunológico efetivo coerente com a pouca força da metástase linfonodal como um preditor de prognóstico. Vale lembrar que estudos em modelos animais poderiam comprovar funcionalmente nossos resultados.

CONCLUSÕES

Nossos dados nos permitem concluir:

1. Tumores malignos apresentam-se enriquecidos com linfócitos T, linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B, linfócitos NK, linfócitos Treg, macrófagos e linfócitos T de memória. Uma vez que houve estreita correlação estatística entre a infiltração de múltiplas células imunológicas, fizemos uma análise multivariada que mostrou associações independentes. De fato, a malignidade foi independentemente associada à infiltração de linfócitos T enquanto que a benignidade foi independentemente associada à infiltração de linfócitos T citotóxicos.
2. A menor idade ao diagnóstico foi independentemente associada à infiltração de linfócitos T citotóxicos. Já o menor tamanho tumoral foi associado à infiltração de linfócitos NK e à ausência de linfócitos T de memória, que também se associou à presença de multifocalidade. A presença de invasão extratiroideana se associou à infiltração de linfócitos T e ausência de infiltração de linfócitos T auxiliares. A presença de metástase ao diagnóstico se associou independentemente à infiltração de linfócitos T, linfócitos T auxiliares e macrófagos.
3. A infiltração de células ativadas (CD69+, GRANZIMA B+ e CD25+) são mais frequentes em tumores malignos.
4. A metástase ao diagnóstico se associou independentemente à infiltração de linfócitos CD69+.
5. A expressão de COX2, IL-10, IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-17 e CD134 foi mais frequente em tecidos malignos do que tecidos benignos.

6. A expressão de proteínas como COX2, IL-10, IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-17, ROR γ T e CD134 está intimamente correlacionada à infiltração de um misto de células do sistema imunológico, sugerindo que a composição do microambiente inflamatório tumoral seja determinado por complexas interações entre células tumorais e células imunológicas.
7. A expressão de COX2, juntamente com a infiltração de linfócitos T citotóxicos são preditores independentes do pior prognóstico dos pacientes estudados. Interessantemente, a classificação de risco de recorrência ganha incremento de acurácia quando levamos em consideração estes fatores imunológicos, sugerindo uma possível aplicação clínica dos nossos achados. A expressão de CD134 se associou independentemente à ausência de metástase ao diagnóstico.
8. Tumores de crianças e adolescentes mais frequentemente apresentam infiltração de linfócitos T citotóxicos, sendo notada uma estreita correlação entre a infiltração destes e a infiltração de linfócitos CD69+. Ainda, notamos que tumores de crianças e adolescentes frequentemente apresentam expressão de CD134 abolida, o que poderia explicar a alta taxa de metástases ao diagnóstico encontrada neste grupo.
9. O microambiente inflamatório de metástases linfonodais, se comparado ao do tumor primário, apresenta maior densidade de linfócitos GRANZIMA B+ e menor expressão tumoral de COX2 e IL-10, sugerindo que a metástase linfonodal apresente característica de uma resposta imunológica bem sucedida. Isso explicaria por que a presença de metástases linfonodais não seria forte preditor do prognóstico de pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide.

REFERÊNCIAS

1. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2010 Aug;22(6):395-404.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014 Jan-Feb;64(1):9-29.
3. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA. 2006 May 10;295(18):2164-7.
4. Burgess JR, Tucker P. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. Thyroid. 2006 Jan;16(1):47-53.
5. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
6. Instituto Nacional do Câncer (INCA)- Incidência do Câncer no Brasil, estimativa 2012. Disponível em <http://www.incagov.br/estimativa/2012/>. 2010 Aug;consultado em 02/12/2011.
7. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. J Cancer Epidemiol. 2013;2013:965212.
8. Mahoney MC, Lawvere S, Falkner KL, Averkin YI, Ostapenko VA, Michalek AM, et al. Thyroid cancer incidence trends in Belarus: examining the impact of Chernobyl. Int J Epidemiol. 2004 Oct;33(5):1025-33.
9. Schonfeld SJ, Lee C, Berrington de Gonzalez A. Medical exposure to radiation and thyroid cancer. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2011 May;23(4):244-50.

10. Ng AK, Kenney LB, Gilbert ES, Travis LB. Secondary Malignancies Across the Age Spectrum. *Semin Radiat Oncol*. 2010 Jan;20(1):67-78.
11. Hamatani K, Eguchi H, Ito R, Mukai M, Takahashi K, Taga M, et al. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res*. 2008 Sep 1;68(17):7176-82.
12. Nikiforov YE. Is Ionizing Radiation Responsible for the Increasing Incidence of Thyroid Cancer? *Cancer-Am Cancer Soc*. 2010 Apr 1;116(7):1626-8.
13. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, MonforteMunoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res*. 1997 May 1;57(9):1690-4.
14. Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: Increased detection or higher radiation exposure? *Horm-Int J Endocrino*. 2010 Apr-Jun;9(2):103-8.
15. Dijkstra B, Prichard RS, Lee A, Kelly LM, Smyth PPA, Crotty T, et al. Changing patterns of thyroid carcinoma. *Irish J Med Sci*. 2007 Jun;176(2):87-90.
16. Ito Y, Miyauchi A. Prognostic factors and therapeutic strategies for differentiated carcinomas of the thyroid. *Endocr J*. 2009;56(2):177-92.
17. Pinchera A. Thyroid incidentalomas. *Horm Res*. 2007;68 Suppl 5:199-201.
18. Rago T, Fiore E, Scutari M, Santini F, Di Coscio G, Romani R, et al. Male sex, single nodularity, and young age are associated with the risk of finding a papillary thyroid cancer on fine-needle aspiration cytology in a large series of patients with nodular thyroid disease. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2010 Apr;162(4):763-70.
19. Witt RL, McNamara AM. Prognostic factors in mortality and morbidity in patients with

differentiated thyroid cancer. *Ear Nose Throat J.* 2002 Dec;81(12):856-63.

20. Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PP. Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1997 Nov;82(11):3553-62.

21. Oyer SL, Smith VA, Lentsch EJ. Sex is not an independent risk factor for survival in differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope.* 2013 Apr 5.

22. Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer-Am Cancer Soc.* 2002 May 1;94(9):2511-6.

23. Brierley JD, Panzarella T, Tsang RW, Gospodarowicz MK, O'Sullivan B. A comparison of different staging systems predictability of patient outcome. Thyroid carcinoma as an example. *Cancer-Am Cancer Soc.* 1997 Jun 15;79(12):2414-23.

24. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American journal of medicine.* 1994 Nov;97(5):418-28.

25. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery.* 1993 Dec;114(6):1050-7; discussion 7-8.

26. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World journal of surgery.* 2002 Aug;26(8):879-85.

27. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and

course of papillary thyroid carcinoma. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 1990 Aug;71(2):414-24.

28. Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, et al. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. European journal of cancer. 1979 Aug;15(8):1033-41.

29. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. Surgery. 1988 Dec;104(6):947-53.

30. Shaha AR, Loree TR, Shah JP. Prognostic factors and risk group analysis in follicular carcinoma of the thyroid. Surgery. 1995 Dec;118(6):1131-6; discussion 6-8.

31. Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, Cooper DS, et al. Prospective multicenter study of thyroiscarcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. Cancer-Am Cancer Soc. 1998 Sep 1;83(5):1012-21.

32. American Thyroid Association Guidelines Taskforce on Thyroid N, Differentiated Thyroid C, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2009 Nov;19(11):1167-214.

33. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Molecular biology of thyroid cancer initiation. Clin Transl Oncol. 2007 Nov;9(11):686-93.

34. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu ZW, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. J Clin Invest. 2005 Jan;115(1):94-101.

35. Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avenia N, Cavaliere A, et al. Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). *Clin Endocrinol*. 2006 Jan;64(1):105-9.
36. Hou P, Liu DX, Xing MZ. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle*. 2007 Feb 1;6(3):377-9.
37. Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing MZ. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer and Its Value in Tailoring Initial Treatment A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine*. 2012 Sep;91(5):274-86.
38. Oler G, Cerutti JM. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer-Am Cancer Soc*. 2009 Mar 1;115(5):972-80.
39. Romitti M, Ceolin L, Siqueira DR, Ferreira CV, Wajner SM, Maia AL. Signaling pathways in follicular cell-derived thyroid carcinomas (Review). *Int J Oncol*. 2013 Jan;42(1):19-28.
40. Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, Vorontsova TV, Mondellini P, Bongarzone I, et al. Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res*. 1995 Dec 1;55(23):5617-20.
41. Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M, et al. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene*. 1997 Sep 11;15(11):1263-73.
42. Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, et al. Age-

related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocr Metab.* 1996 May;81(5):2006-9.

43. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, et al. ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res.* 2002 Dec 15;62(24):7284-90.

44. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Basolo F, Castellone MD, Melillo RM, et al. Efficient inhibition of RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic kinases by 4-amino-5-(4-chloro-phenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2003 Apr;88(4):1897-902.

45. Lanzi C, Cassinelli G, Cuccuru G, Zaffaroni N, Supino R, Vignati S, et al. Inactivation of Ret/Ptc1 oncoprotein and inhibition of papillary thyroid carcinoma cell proliferation by indolinone RPI-1. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jul;60(7):1449-59.

46. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol.* 1990 Oct;4(10):1474-9.

47. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Farr CJ, Hughes D, Padua RA, et al. Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res.* 1988 Aug 15;48(16):4459-63.

48. Hou P, Liu DX, Shan Y, Hu SY, Studeman K, Condouris S, et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1161-70.

49. Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJA, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65(22):10199-207.

50. Wang Y, Hou P, Yu H, Wang W, Ji M, Zhao S, et al. High prevalence and mutual

exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007 Jun;92(6):2387-90.

51. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):292-306.

52. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol*. 2004 Winter;15(4):319-27.

53. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, et al. Unique Association of P53 Mutations with Undifferentiated but Not with Differentiated Carcinomas of the Thyroid-Gland. *Cancer Res*. 1992 Mar 1;52(5):1369-71.

54. Battista S, Martelli ML, Fedele M, Chiappetta G, Trapasso F, Devita G, et al. A Mutated P53 Gene Alters Thyroid-Cell Differentiation. *Oncogene*. 1995 Nov 16;11(10):2029-37.

55. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012 Sep-Oct;62(5):309-35.

56. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007 May;121(1):1-14.

57. Haanen JB, Baars A, Gomez R, Weder P, Smits M, de Gruijl TD, et al. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2006 Apr;55(4):451-8.

58. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with

favorable prognosis in ovarian cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005 Dec 20;102(51):18538-43.

59. Yoshimoto M, Sakamoto G, Ohashi Y. Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. Cancer-Am Cancer Soc. 1993 Nov 15;72(10):2993-3001.

60. Reichert TE, Day R, Wagner EM, Whiteside TL. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. Cancer Res. 1998 Dec 1;58(23):5344-7.

61. Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, Iida S, Ichimaru N, Nagamoto N, et al. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. The Annals of thoracic surgery. 2000 Nov;70(5):1634-40.

62. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Res. 1998 Aug 15;58(16):3491-4.

63. Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. Transplantation reviews. 1971;7:3-25.

64. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. The Yale journal of biology and medicine. 1982 May-Aug;55(3-4):329-33.

65. Klein G. Immune surveillance--a powerful mechanism with a limited range. National Cancer Institute monograph. 1976 Nov;44:109-13.

66. Lewis JD, Reilly BD, Bright RK. Tumor-associated antigens: from discovery to immunity. International reviews of immunology. 2003 Mar-Apr;22(2):81-112.

67. Neville AM, Mackay AM, Westwood J, Turberville C, Laurence DJ. Human tumour-associated and tumour-specific antigens: some concepts in relation to clinical oncology. Journal

of clinical pathology Supplement. 1975;6:102-12.

68. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 2002 Nov;3(11):991-8.

69. French JD. Revisiting immune-based therapies for aggressive follicular cell-derived thyroid cancers. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2013 May;23(5):529-42.

70. Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011 Aug;60(8):1161-71.

71. Smith WL, Meade EA, DeWitt DL. Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994 Nov 15;744:50-7.

72. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*. 2000 Mar 1;60(5):1306-11.

73. Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimoto T, Namiki M, et al. Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *The Prostate*. 2002 Nov 1;53(3):232-40.

74. Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res*. 2003 Feb 1;63(3):713-22.

75. Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res*. 1999 Sep 1;59(17):4356-62.

76. Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lampe P, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, et al. Role of cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in pancreatic carcinogenesis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011 Sep 28;17(36):4113-7.
77. Leung WK, To KF, Go MY, Chan KK, Chan FK, Ng EK, et al. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int J Oncol*. 2003 Nov;23(5):1317-22.
78. Lee NO, Park JW, Lee JA, Shim JH, Kong SY, Kim KT, et al. Dual action of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on vascular endothelial growth factor expression in human hepatocellular carcinoma cells: novel involvement of discoidin domain receptor 2. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2012 Jan;138(1):73-84.
79. Markosyan N, Chen EP, Evans RA, Ndong V, Vonderheide RH, Smyth EM. Mammary carcinoma cell derived cyclooxygenase 2 suppresses tumor immune surveillance by enhancing intratumoral immune checkpoint activity. *Breast cancer research : BCR*. 2013;15(5):R75.
80. Ota Y, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Takami S, Oyamada T, et al. Prostaglandin synthases influence thyroid follicular cell proliferation but not carcinogenesis in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2012 Jun;127(2):339-47.
81. Zhou G, Drake CG, Levitsky HI. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood*. 2006 Jan 15;107(2):628-36.
82. Bogen B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *European journal of immunology*. 1996 Nov;26(11):2671-9.
83. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, et al.

Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 Feb 3;95(3):1178-83.

84. Willimsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. Nature. 2005 Sep 1;437(7055):141-6.

85. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. Nature medicine. 1999 Jun;5(6):677-85.

86. Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Bersani I, Bono A, et al. Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. Cancer Res. 2003 May 15;63(10):2535-45.

87. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. British journal of cancer. 2011 Jun 28;105(1):93-103.

88. Oshikiri T, Miyamoto M, Shichinohe T, Suzuoki M, Hiraoka K, Nakakubo Y, et al. Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. Journal of surgical oncology. 2003 Dec;84(4):224-8.

89. Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, Timar J. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. Clin Cancer Res. 2004 Jan 15;10(2):521-30.

90. Hillen F, Baeten CI, van de Winkel A, Creyten D, van der Schaft DW, Winnepeninckx V, et al. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2008 Jan;57(1):97-

106.

91. Dailey ME, Lindsay S, Skahen R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. *AMA archives of surgery*. 1955 Feb;70(2):291-7.
92. Dhar DK, Kubota H, Kotoh T, Tabara H, Watanabe R, Tachibana M, et al. Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg*. 1998 Nov;176(5):442-7.
93. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2008 Dec;15(4):1069-74.
94. Fiumara A, Belfiore A, Russo G, Salomone E, Santonocito GM, Ippolito O, et al. In situ evidence of neoplastic cell phagocytosis by macrophages in papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997 May;82(5):1615-20.
95. Matsubayashi S, Kawai K, Matsumoto Y, Mukuta T, Morita T, Hirai K, et al. The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995 Dec;80(12):3421-4.
96. Gupta S, Patel A, Folstad A, Fenton C, Dinauer CA, Tuttle RM, et al. Infiltration of differentiated thyroid carcinoma by proliferating lymphocytes is associated with improved disease-free survival for children and young adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001 Mar;86(3):1346-54.
97. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc*. 1986 Dec;61(12):978-96.
98. Souza SL, Montalli Da Assumpcao LV, Ward LS. Impact of previous thyroid

autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2003 May;13(5):491-5.

99. Hirabayashi RN, Lindsay S. The Relation of Thyroid Carcinoma and Chronic Thyroiditis. *Surg Gynecol Obstet*. 1965 Aug;121:243-52.

100. Holm LE, Blomgren H, Lowhagen T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *The New England journal of medicine*. 1985 Mar 7;312(10):601-4.

101. 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 : official journal of the American Thyroid Association*. 1998 Mar;8(3):197-202.

102. 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*. 1999 Dec;126(6):1070-6; discussion 6-7.

103. Loh KC, Greenspan FS, Dong F, Miller TR, Yeo PP. Influence of lymphocytic thyroiditis on the prognostic outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999 Feb;84(2):458-63.

104. Schaffler A, Palitzsch KD, Seiffarth C, Hohne HM, Riedhammer FJ, Hofstadter F, et al. Coexistent thyroiditis is associated with lower tumour stage in thyroid carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 1998 Oct;28(10):838-44.

105. Ramos AM, Sales Ade O, Barbalho de Mello LE, Cirino de Andrade M, Pinto Paiva F, Ramos CC, et al. Absence of peritumoral fibrosis or inflammatory infiltrate may be related to clinical progression of papillary thyroid microcarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2009 Dec;17(6):432-7.

106. Kebebew E, Treseler PA, Ituarte PH, Clark OH. Coexisting chronic lymphocytic

thyroiditis and papillary thyroid cancer revisited. *World J Surg.* 2001 May;25(5):632-7.

107. Del Rio P, Cataldo S, Sommaruga L, Concione L, Arcuri MF, Sianesi M. The association between papillary carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis: does it modify the prognosis of cancer? *Minerva Endocrinol.* 2008 Mar;33(1):1-5.

108. Muzza M, Degl'Innocenti D, Colombo C, Perrino M, Ravasi E, Rossi S, et al. The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010 May;72(5):702-8.

109. French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, Said S, Kloppner JP, Haugen BR. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2010 May;95(5):2325-33.

110. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012 Dec;77(6):918-25.

111. Cunha LL, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration of a mixture of different immune cells may be related to molecular profile of differentiated thyroid cancer. *Endocrine-related cancer.* 2012 Jun;19(3):L31-6.

112. Villagelin DG, Santos RB, Romaldini JH. Is diffuse and peritumoral lymphocyte infiltration in papillary thyroid cancer a marker of good prognosis? *Journal of endocrinological investigation.* 2011 Dec;34(11):e403-8.

113. Modi J, Patel A, Terrell R, Tuttle RM, Francis GL. Papillary thyroid carcinomas from young adults and children contain a mixture of lymphocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2003 Sep;88(9):4418-25.

114. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Menard S, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10;27(11):1746-52.
115. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, et al. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med*. 2008;6:19.
116. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grussel S, Sipos B, 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.
117. Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer*. 2011 Jun 28.
118. Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics*. 2012;67(5):483-8.
119. Hay ID, Gonzalez-Losada T, Reinalda MS, Honetschlager JA, Richards ML, Thompson GB. Long-term outcome in 215 children and adolescents with papillary thyroid cancer treated during 1940 through 2008. *World journal of surgery*. 2010 Jun;34(6):1192-202.
120. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
121. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Advances in immunology*. 1989;47:187-376.
122. Caillou B, Talbot M, Weyemi U, Pioche-Durieu C, Al Ghuzlan A, Bidart JM, et al. Tumor-associated macrophages (TAMs) form an interconnected cellular supportive network in anaplastic thyroid carcinoma. *PloS one*. 2011;6(7):e22567.
123. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in*

immunology. 2002 Nov;23(11):549-55.

124. Herrmann G, Schumm-Draeger PM, Muller C, Atai E, Wenzel B, Fabian T, et al. T lymphocytes, CD68-positive cells and vascularisation in thyroid carcinomas. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1994;120(11):651-6.

125. Ryder M, Gild M, Hohl TM, Pamer E, Knauf J, Ghossein R, et al. Genetic and pharmacological targeting of CSF-1/CSF-1R inhibits tumor-associated macrophages and impairs BRAF-induced thyroid cancer progression. *PloS one*. 2013;8(1):e54302.

126. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011 Jan 7;331(6013):44-9.

127. Gogali F, Paterakis G, Rassidakis GZ, Kaltsas G, Liakou CI, Gousis P, et al. Phenotypical analysis of lymphocytes with suppressive and regulatory properties (Tregs) and NK cells in the papillary carcinoma of thyroid. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 May;97(5):1474-82.

128. Liapi C, Gogali F, Paterakis G, Rassidakis GZ, Liakou CI. CD3-CD16-CD56bright immunoregulatory NK cells are increased in the tumor microenvironment and inversely correlate with advanced stages in patients with papillary thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2013 May 31.

129. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 2001 May 15;97(10):3146-51.

130. Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *European journal of immunology*. 1992 Jan;22(1):1-6.

131. Janeway C. Immunobiology : the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science; 2005.
132. Starska K, Glowacka E, Kulig A, Lewy-Trenda I, Brys M, Lewkowicz P. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity--the expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+, CD26+, HLA/DR+ activation markers on T CD4+ and CD8+ cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. *Folia histochemica et cytobiologica* / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society. 2011;49(4):579-92.
133. Poschke I, De Boniface J, Mao Y, Kiessling R. Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012 Oct 1;131(7):1611-20.
134. De Maria R, Cifone MG, Trotta R, Rippo MR, Festuccia C, Santoni A, et al. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *The Journal of experimental medicine*. 1994 Nov 1;180(5):1999-2004.
135. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology*. 2005 Mar;26(3):136-40.
136. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1988 Nov 1;168(5):1621-37.
137. Santis AG, Campanero MR, Alonso JL, Tugores A, Alonso MA, Yague E, et al. Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *European journal of immunology*. 1992 May;22(5):1253-9.

138. Sancho D, Gomez M, Viedma F, Esplugues E, Gordon-Alonso M, Garcia-Lopez MA, et al. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*. 2003 Sep;112(6):872-82.
139. Han Y, Guo Q, Zhang M, Chen Z, Cao X. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology*. 2009 Jan 1;182(1):111-20.
140. Zhu J, Feng A, Sun J, Jiang Z, Zhang G, Wang K, et al. Increased CD4(+) CD69(+) CD25(-) T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011 Oct;26(10):1519-26.
141. Starska K, Glowacka E, Kulig A, Lewy-Trenda I, Brys M, Lewkowicz P. Prognostic value of the immunological phenomena and relationship with clinicopathological characteristics of the tumor--the expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+, CD26+, HLA/DR+ activation markers on T CD4+ and CD8+ lymphocytes in squamous cell laryngeal carcinoma. Part II. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2011;49(4):593-603.
142. Nowicka A, Rogala E, Bednarek W, Barczynski B, Wertel I, Piekarczyk W, et al. [Lymphocyte activation markers in patients with ovarian cancer]. *Ginekologia polska*. 2012 Oct;83(10):737-43.
143. Cunha LL, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in papillary thyroid carcinomas. *Journal of endocrinological investigation*. 2011 Oct;34(9):733.
144. Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G. COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study. *International journal of medical sciences*. 2012;9(3):237-42.

145. Cornetta AJ, Russell JP, Cunnane M, Keane WM, Rothstein JL. Cyclooxygenase-2 expression in human thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope*. 2002 Feb;112(2):238-42.
146. Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, et al. Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms. *Histopathology*. 2003 May;42(5):492-7.
147. Kajita S, Ruebel KH, Casey MB, Nakamura N, Lloyd RV. Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005 Feb;18(2):221-7.
148. Scarpino S, Duranti E, Stoppacciaro A, Pillozzi E, Natoli G, Sciacchitano S, et al. COX-2 is induced by HGF stimulation in Met-positive thyroid papillary carcinoma cells and is involved in tumour invasiveness. *The Journal of pathology*. 2009 Aug;218(4):487-94.
149. Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S, Hommura F, Kinoshita I, Ogura S, et al. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer science*. 2003 Nov;94(11):1003-9.
150. Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):5947-52.
151. Redegeld F, Filippini A, Sitkovsky M. Comparative studies of the cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity and of extracellular ATP-induced cell lysis. Different requirements in extracellular Mg²⁺ and pH. *Journal of immunology*. 1991 Nov 15;147(10):3638-45.
152. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory

effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3812-9.

153. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2011 Sep 26;208(10):1949-62.

154. Bellone M, Calcinotto A. Ways to enhance lymphocyte trafficking into tumors and fitness of tumor infiltrating lymphocytes. *Frontiers in oncology*. 2013;3:231.

155. Bellone M, Mondino A, Corti A. Vascular targeting, chemotherapy and active immunotherapy: teaming up to attack cancer. *Trends in immunology*. 2008 May;29(5):235-41.

156. Gajewski TF, Furtado M, Spaapen R, Zheng Y, Kline J. Molecular profiling to identify relevant immune resistance mechanisms in the tumor microenvironment. *Current opinion in immunology*. 2011 Apr;23(2):286-92.

157. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunological reviews*. 2006 Oct;213:131-45.

158. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine*. 2007 Jul;13(7):828-35.

159. Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nature reviews Immunology*. 2008 Jan;8(1):74-80.

160. Moretti S, Menicali E, Voce P, Morelli S, Cantarelli S, Sponziello M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) is up-regulated in thyroid carcinoma and drives the development of an immunosuppressant tumor microenvironment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014 May;99(5):E832-40.

161. Cunha LL, Marcello MA, Ward LS. The role of the inflammatory microenvironment in

thyroid carcinogenesis. *Endocrine-related cancer*. 2014 Jun;21(3):R85-R103.

162. Cunha LL, Marcello MA, Morari EC, Nonogaki S, Conte FF, Gerhard R, et al. Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocrine-related cancer*. 2013 Feb;20(1):103-10.

163. French JD, Kotnis GR, Said S, Raeburn CD, McIntyre RC, Jr., Klopper JP, et al. Programmed death-1+ T cells and regulatory T cells are enriched in tumor-involved lymph nodes and associated with aggressive features in papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Jun;97(6):E934-43.

ANEXOS

São Paulo, 14 de Junho de 2010.

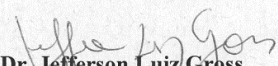
Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1259/09-B
“Análise de Biomarcadores de Resposta Imunológica em Carcinoma bem Diferenciado da Tireóide”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 08/06/2010, **tomaram conhecimento e aprovaram** a seguinte solicitação:

- Solicitação de dispensa da apreciação do estudo intitulado **“Estudo de mecanismos de evasão tumoral ao sistema imunológico empregados pelo carcinoma diferenciado da tireóide”**, em razão de este estudo estar inserido em projeto supracitado, previamente aprovado por este comitê.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Artigos publicados durante o período

1. **Cunha LL**, Marcello MA, Nonogaki S, Morari EC, Soares FA, Vassallo J, et al. CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes and COX2 expression may predict relapse in differentiated thyroid cancer. *Clinical endocrinology*. 2014 Aug 16.
2. **Cunha LL**, Marcello MA, Ward LS. The role of the inflammatory microenvironment in thyroid carcinogenesis. *Endocrine-related cancer*. 2014 Jun;21(3):R85-R103.
3. Marcello MA, Malandrino P, Almeida JF, Martins MB, **Cunha LL**, Bufalo NE, et al. The influence of the environment on the development of thyroid tumors: a new appraisal. *Endocrine-related cancer*. 2014 Oct;21(5):T235-54.
4. Marcello MA, **Cunha LL**, Batista FA, Ward LS. Obesity and thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2014 Oct;21(5):T255-71.
5. **Cunha LL**, Ferreira Rde C, de Matos PS, da Assumpcao LV, Ward LS. Both gender and concurrent chronic lymphocytic thyroiditis may influence the nuclear texture of papillary thyroid carcinomas cells. *Endocrine research*. 2014;39(3):126-9.
6. Pascutti F, **Cunha LL**, Rizzatti EG, Colleoni GW. Understanding myeloma cancer stem cells. *Immunotherapy*. 2013 Dec;5(12):1291-4.
7. Martins MB, Marcello MA, Morari EC, **Cunha LL**, Soares FA, Vassallo J, et al. Clinical utility of KAP-1 expression in thyroid lesions. *Endocrine pathology*. 2013 Jun;24(2):77-82.
8. Marcello MA, Morari EC, **Cunha LL**, De Nadai Silva AC, Carraro DM, Carvalho AL, et al. P53 and expression of immunological markers may identify early stage thyroid tumors. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:846584.
9. Ferreira RC, **Cunha LL**, Matos PS, Adam RL, Soares F, Vassallo J, et al. Chromatin changes in papillary thyroid carcinomas may predict patient outcome. *Cellular oncology*. 2013

Jun;36(3):259-64.

10. **Cunha LL**, Marcello MA, Vassallo J, Ward LS. Differentiated thyroid carcinomas and their B7H1 shield. *Future oncology*. 2013 Oct;9(10):1417-9.
11. **Cunha LL**, Marcello MA, Morari EC, Nonogaki S, Conte FF, Gerhard R, et al. Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocrine-related cancer*. 2013 Feb;20(1):103-10.
12. Chiappini F, Ramadoss P, Vella KR, **Cunha LL**, Ye FD, Stuart RC, et al. Family members CREB and CREM control thyrotropin-releasing hormone (TRH) expression in the hypothalamus. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013 Jan 5;365(1):84-94.
13. Barbieri RB, Bufalo NE, **Cunha LL**, Assumpcao LV, Maciel RM, Cerutti JM, et al. Genes of detoxification are important modulators of hereditary medullary thyroid carcinoma risk. *Clinical endocrinology*. 2013 Aug;79(2):288-93.
14. de Lima Junior MM, Reis LO, Guilhen AC, Granja F, de Lima Oliveira MN, Ferreira U, et al. N-acetyltransferase-2 gene polymorphisms and prostate cancer susceptibility in Latin American patients. *Medical oncology*. 2012 Dec;29(4):2889-94.
15. **Cunha LL**, Ward LS. Concurrent lymphocytic thyroiditis is associated to less aggressive papillary thyroid carcinomas. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2012 Feb;269(2):699-700.
16. **Cunha LL**, Ward LS. Homer's Odyssey and Brazilian universities. *Clinics*. 2012 Nov;67(11):1235.
17. **Cunha LL**, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics*. 2012;67(5):483-8.
18. **Cunha LL**, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration

of a mixture of different immune cells may be related to molecular profile of differentiated thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2012 Jun;19(3):L31-6.

19. **Cunha LL**, Morari EC, Guihen AC, Razolli D, Gerhard R, Nonogaki S, et al. Infiltration of a mixture of immune cells may be related to good prognosis in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clinical endocrinology*. 2012 Dec;77(6):918-25.