

JOYCE DO ROSÁRIO DA SILVA

**ANÁLISE CRÍTICA DA EXPRESSÃO DO GENE
DA MUCINA 1 (*MUC1*) NO CARCINOMA
PAPILÍFERO DA TIRÓIDE: CORRELAÇÕES
CLÍNICAS E ANATOMO-PATOLÓGICAS**

CAMPINAS – UNICAMP

2009

JOYCE DO ROSÁRIO DA SILVA

**ANÁLISE CRÍTICA DA EXPRESSÃO DO GENE DA
MUCINA 1 (*MUC1*) NO CARCINOMA PAPILÍFERO
DA TIRÓIDE: CORRELAÇÕES CLÍNICAS E
ANATOMO-PATOLÓGICAS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pos –
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do Título de Doutor em Clínica Médica*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS, UNICAMP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Silva, Joyce do Rosário da

Sixxxa Análise crítica da expressão do gene da mucina 1 (MUC1) no carcinoma papilífero da tireóide: correlações clínicas e anatomo-patológicas / Joyce do Rosário da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Laura Sterian Ward

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

**Título em inglês : MUC1 critical gene expression in the papillary thyroid
câncer : clinical and pathological correlations**

Keywords: • Thyroid
• Neoplasm, thyroid
• Genetic Predisposition for Dsease
• Carcinoma, Papillary
• Carcinoma, Papillary, Follicular

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Profa. Dra. Gláucia Maria Ferreira da Silva Mazeto

Prof. Dr. Alfio José Tincani

Prof. Dr. José Vassallo

Prof. Dr. Eduardo Tomimori

Data da defesa: 05-02-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Joyce do Rosário da Silva

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Laura Sterian Ward

Membros:

1. Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Maria Ferreira da Silva Mazeto 

2. Prof. Dr. Alfio Jose Tincani 

3. Prof. Dr. Jose Vassallo 

4. Prof. Dr. Eduardo Tomimori 

5. Prof^ª. Dr^ª. Laura Sterian Ward 

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/02/2009

DEDICATÓRIA

A meus pais, irmãos, amigos que foram simplesmente essenciais para a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Laura que sempre acreditou em mim e me incentivou para que eu continuasse na vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus amigos, pais e irmãos que me deram apoio incondicional nos momentos mais difíceis, sem eles os obstáculos seriam intransponíveis.

A amiga Elaine Morari pela ajuda inestimável

À Prof^a. Dr^a. Laura Ward pela paciência

Ao Prof. Dr. Fernando Soares que nos cedeu grande parte do material necessário para a realização deste estudo

Ao Prof Dr. Jose Vassallo pelo apoio na análise dos dados de imunoistoquímica

“Os momentos mais esplêndidos da vida não são os chamados dias de êxito, mas sim aqueles que saindo do desespero e da angústia, sentimos erguer-se dentro de nós um desafio à vida e à promessa de futuras realizações”.

Flaubert

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1 INTRODUÇÃO	43
A. CÂNCER DE TIRÓIDE	44
A.1. Aspectos Gerais	44
A.2. Fatores de Risco Prognóstico	44
A.3. Patologia Molecular do Carcinoma Papilífero	45
B. Mucinas	48
B.1. <i>MUC1</i>	51
B.2. <i>MUC1</i> e o Câncer de Tiróide	54
2. OBJETIVOS	57
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	59
3. CASUÍSTICA	60
4. MÉTODO	64
4.A. IMUNOISTOQUÍMICA	65
4.A.1. TISSUE ARRAY	65
4.A.2. REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE	65
4.A.3. LEITURA DOS RESULTADOS	66
4.B. PCR EM TEMPO REAL	67
4.B.1. EXTRAÇÃO DE RNA	67
4.B.2. SÍNTESE DE c DNA	69
4.B.3. QUANTIFICAÇÃO - PCR EM TEMPO REAL	69
4.C. METODOLOGIA ESTATÍSTICA	72
4.C.1. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS	73
5. RESULTADOS	75
5.A. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>MUC1</i>	76
1. <i>MUC1</i> POR IMUNOISTOQUÍMICA	76
2. ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL	78

5.B. AVALIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA	83
1.DADOS CLÍNICOS	83
2. DADOS DO TUMOR	87
5.C. AVALIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES COM A INVASÃO TUMORAL	93
1.DADOS CLÍNICOS	93
2. DADOS DO TUMOR	97
5.D. AVALIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES COM A MORTE CAUSADA PELO TUMOR	100
1.DADOS CLÍNICOS	100
2.DADOS DO TUMOR	101
6.DISSCUSSÃO	103
7. CONCLUSÃO	115
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
9. APÊNDICES	135

LISTA DE ABREVIATURAS

AcTg	anticorpo anti-tireoglobulina
AF	adenoma folicular
BRAF	oncogene de sarcoma viral murino v-raf homologia B1
c AMP	AMP cíclico
CDT	câncer diferenciado da tiróide
CF	carcinoma folicular
CP	carcinoma papilífero
CPC	carcinoma papilífero clássico
CPCA	carcinoma papilífero células altas
CPED	carcinoma papilífero esclerosante difusa
CPOn	carcinoma papilífero oncocítico
CPVF	carcinoma papilífero variante folicular
CT	câncer de tiróide
DNA	ácido desoxiribonucleico
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
I ₁₃₁	iodo radioativo
IL	interleucina
IRMA	ensaio imunoradiométrico
LT4	levotiroxina
m Ci	milicuries
<i>MUC1</i>	mucina 1
mUI/L	miliunidades por litro
ng/dl	nanogramas por decilitro
NIS	simportador de sódio e iodo
PAAF	punção aspirativa por agulha fina
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA _m	mensageiro do ácido ribonucléico

RAS	vírus sarcoma de rato
SC	subcutâneo
Tg	tireoglobulina
TSH	hormônio tireotrófico
TNM	Tumor Nódulo Metástase

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS

TABELAS		Pág.
TABELA 1	Mucinas humanas	136
TABELA 2	Características clínicas dos pacientes	61
TABELA 3	Características tumorais dos pacientes	63
TABELA 4	Sistema TNM	137
TABELA 5	Estratificação de Risco para CDT	138
TABELA 6	Dados Clínicos e a relação com a Evolução	139
TABELA 7	Dados do Tumor e a relação com a Evolução	140
TABELA 8	Dados Clínicos e a Invasão Tumoral	141
TABELA 9	Dados do Tumor e a Invasão Tumoral	142
TABELA 10	Imunoistoquímica de <i>MUC1</i> e relações com a evolução, invasão tumoral e morte pelo tumor	143
TABELA 11	Imunoistoquímica de <i>MUC1</i> e relações com a evolução, invasão tumoral e morte pelo tumor	144
TABELA 12	<i>MUC1</i> por Real Time PCR e relação com dados clínicos e tumorais	145

FIGURAS

FIGURA 1	Modelo de biossíntese e secreção de mucinas glicoprotéicas numa célula globosa ou mucosa.	49
FIGURA 2	Imunohistoquímica para MUC 1 demonstrando negatividade	68
FIGURA 3	Imunohistoquímica com positividade 4, forte intensidade para MUC 1	69
FIGURA 4	Figura demonstrativa dos dados gerados por PCR em tempo real. No gráfico, mostramos as curvas do gene MUC 1 e do controle endógeno GAPDH	71
FIGURA 5	Curva de Kaplan-Meier para o tempo livre de doença entre MUC 1 total positivo ou negativo	77
FIGURA 6	Curva de Kaplan – Meier para o Tempo Livre de Doença entre a Presença ou Ausência de Tiroidite	89

GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Relação entre a expressão do gene <i>MUC1</i> por Real-Time PCR e a presença de metástases no diagnóstico	79
GRÁFICO 2	Relação entre o sexo masculino e feminino e evolução clínica	83
GRÁFICO 3	Relação entre os diferentes estadios para o câncer da tiróide e a evolução clínica	85
GRÁFICO 4	Relação entre a presença de metástases ao diagnóstico e a evolução clínica	86
GRÁFICO 5	Relação entre a presença de tiroidite no exame anatomopatológico e a evolução clínica	88
GRÁFICO 6	Relação entre a presença de invasão tumoral no anatomopatológico e a evolução clínica	91
GRÁFICO 7	Relação entre os diferentes tamanhos de tumores e a evolução clínica.	91
GRÁFICO 8	Relação entre a Etnia e a Invasão Tumoral	93
GRÁFICO 9	Relação entre o estadio clínico e a Invasão Tumoral.	95
GRÁFICO 10	Relação entre a presença de metástases ao diagnóstico e a Invasão Tumoral.	95

GRÁFICO 11	Relação entre a tiroidite no anatomo-patológico e a Invasão Tumoral	99
GRÁFICO 12	Relação entre a morte causada pelo tumor e a presença de metástases ao diagnóstico	101
GRÁFICO 13	Relação entre a morte causada pelo tumor e os diferentes tamanhos de tumores	101

RESUMO

A maior expressão de *MUC1* tem sido relacionada com o pior prognóstico de diversas malignidades como o câncer de mama e pâncreas. Aproximadamente 20% dos carcinomas diferenciados da tireóide (CDT) evoluem com recidivas locais e a distância. O nosso objetivo foi o de avaliar o gene da *MUC1* nos pacientes com CDT e relacionar com aspectos clínicos e anatomo-patológicos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS: Seleccionamos 150 pacientes portadores de carcinoma papilífero (CP), 57 oriundos do Hospital das Clínicas da UNICAMP, acompanhados por 67 (73,29±39,83) meses, de 1995 a 2008 e 93 pacientes do Hospital AC Camargo - Fundação Antônio Prudente em São Paulo acompanhados por 41,37 (32,5±34,30) meses, de 1998 a 2008. Realizamos análise da expressão do gene da MUC 1 por imunistoquímica e por PCR em Tempo Real e comparamos com dados de evolução clínica e do anatomo-patológico.

RESULTADOS: Observamos a expressão da proteína *MUC1* em 82,19% dos pacientes com CP, no entanto, sem diferenças estatísticas para os dados de evolução clínica e do anatomo-patológico. A análise do RNA-m de *MUC1* se correlacionou com a menor expressão nos indivíduos que apresentaram metástases ao diagnóstico (p valor=0,0216). Observamos a pior evolução: no sexo masculino, quando havia metástases ao diagnóstico, na ausência de tiroidite e nos tumores maiores que 4 cm. A presença de invasão tumoral foi mais freqüente nos indivíduos com ausência de tiroidite em 47% dos casos (p=0,0132; OR 2,473 – 95%IC: 1,198-5,104).

CONCLUSÃO: Não conseguimos correlacionar a análise do gene *MUC1* com aspectos clínicos e anatomo-patológicos de pior prognóstico para o CDT.

ABSTRACT

The over expression of *MUC1* has been related with the worst prognosis in malignancies like breast and pancreas cancer. We know that around 20% of the patients with differentiated thyroid cancer (DTC) can develop local and/or distant recurrences and because of that we decide to analyze the *MUC1* gene in patients with DTC and tried to relate it with clinical and pathological patterns of the thyroid cancer. **PATIENTS AND METHODS:** We selected 150 patients with Papillary Thyroid Cancer: 57 from the Clinical Hospital of Campinas State University, followed up for 67 (73,29±39,83) months, since 1995 to 2008 and 93 patients from the A. C. Camargo Hospital – Antonio Prudente Foundation – São Paulo for 41,37 (32,5±34,3) months since 1998 to 2008. We analyzed the *MUC1* gene with the immunohistochemistry and the Real Time – PCR techniques and compared the results with clinical and pathological data. **RESULTS:** The *MUC1* expression was positive in 82,19% of the patients with papillary thyroid cancer, however, when we compared with clinical and pathological data, there was not statistical significance. The *MUC1* m-RNA analysis was correlated with the less expression of the gene in the individuals who had had metastases at the diagnosis. We could observe the worst outcome in the individuals of the male gender, in the presence of metastases at the diagnosis, in the absence of thyroiditis in the non-neoplastic tissue and in tumors larger than 4 cm. The presence of tumoral invasion was significant in the patients with metastases to the diagnosis and in the ones without thyroiditis in 47% ($p=0,0132$; OR 2,473 – 95% CI: 1,198-5,104). **CONCLUSION:** We conclude that *MUC1* gene analysis was not useful to determine aggressive tumors nor to predict prognosis in papillary thyroid carcinomas.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A) CÂNCER DE TIRÓIDE

A.1) ASPECTOS GERAIS

O câncer da tiróide (CT) é a neoplasia endocrinológica mais comum nos seres humanos, acometendo aproximadamente 1% da população (KNOSTMAN K, 2007 apud SHERMAN SI, 2003), 95% desses tumores têm origem nas células epiteliais foliculares como os carcinomas papilíferos (CP) (e seus subtipos), os foliculares (CF) e os anaplásicos, já os carcinomas medulares correspondem a 5% dos tumores tiroidianos e têm origem nas células C da tiróide. Os CP's constituem um grupo heterogêneo, com diversos subtipos histológicos e são os mais comuns, acometendo aproximadamente 80% dos pacientes, enquanto que os CF's atingem aproximadamente 15% dos indivíduos com carcinoma diferenciado da tiróide (CDT) (KNOSTMAN *et al.*, 2007; AIN, 1995).

A.2) FATORES DE RISCO PARA PIOR PROGNÓSTICO

As taxas de cura alcançadas no tratamento inicial do CP e CF são elevadas no mundo inteiro e também no Brasil (www.inca.gov.br/estimativas). Contudo, alguns pacientes apresentam elevado risco de recorrência e até mesmo morte. Se esses indivíduos pudessem ser identificados no momento do diagnóstico, poderiam receber tratamento e seguimento mais apropriados, e, eventualmente, beneficiarem-se de novas modalidades terapêuticas, em particular as terapias alvo-dirigidas que vem surgindo. Assim, é de fundamental importância o

reconhecimento dos fatores associados à evolução. Entre tais fatores, alguns são bem reconhecidos (HOVENS, 2007 MORGANTI *et al.*, 2005; SCHLUMBERGER & PACINI, 2006; MAZZAFERRI & KLOOS, 2001; REYNOLDS *et al.*, 2005; GULCELIK *et al.*, 2008):

IDADE

SEXO

FATORES RELACIONADOS AO TUMOR *de per se*

- FATORES HISTOPATOLÓGICOS
 - GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR
 - TIPOS HISTOLÓGICOS E VARIANTES
- TAMANHO DO TUMOR:
- MULTIFOCALIDADE E BILATERALIDADE:
- EXTENSÃO EXTRA-TIROIDIANA:
- COMPROMETIMENTO DE LINFONODOS
- METASTÁSES À DISTÂNCIA

DOENÇA AUTOIMUNE DA TIRÓIDE

A.3) PATOLOGIA MOLECULAR DO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIRÓIDE

Os tumores tireoidianos são considerados bons exemplos para se analisar eventos iniciais da tumorigênese em geral (BORRELLO *et al.*, 2008).

REARRANJO RET/PTC

RET é um gene de 21 exons localizado no cromossoma 10q11-2, que codifica um receptor tirosino kinase. A proteína RET é composta de um domínio

extracelular que possui um domínio distal semelhante à caderina e um domínio rico em cisteína justa membrana; um domínio transmembrana e um domínio intracelular com atividade tirosino kinase (EVAN & VOUSDEN, 2001; FAGIN, 2002; WARD & ASSUMPÇÃO, 2004). O gene é normalmente expresso em linhagens neuronais, medula adrenal, células C tiroideas, mas não é expresso nas células foliculares tiroideas normais. Os ligantes da proteína RET são membros da família do fator neurotrópico derivado de células gliais (GDNF) e sob condições normais, induzem dimerização do receptor e trans-fosforilação do domínio kinase do receptor ativando a via da cascata MAP Kinase, que inclui RAS, PI3K, MAPK e JNK. Estas proteínas retransmitem ao núcleo a mensagem para promover divisão celular (RIESCO-EIZAGUIRRE G. & SANTISTEBAN P., 2007). Quando o gene RET sofre uma translocação, não se torna mais necessária a presença do ligante para ativar o receptor e a cascata de ativação torna-se constantemente ativada. A via de sinalização RAS/ b-RAF/ MAP kinase induz a instabilidade genética e previne que a célula entre na via da apoptose (FAGIN, 2002; EVAN & VOUSDEN, 2001; RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2007; KAUF, 2002).

O oncogene *RET/PTC* foi assim denominado por ter sido primariamente evidenciado nos carcinomas papilíferos. Todas as formas ativas do oncogene *RET* são decorrentes rearranjos cromossômicos no qual o domínio 3' funde-se com o domínio 5' de um gene estrangeiro, fazendo com que RET fique constitutivamente expresso na célula folicular tiroidea (RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2007). Por sua vez, a atividade tirosino kinase continuada estimula uma cascata de sinais de crescimento que promove a neoplasia tiroidea. (FAGIN, 2002;

WARTOFSKY & NOSTRAND, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2000; RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2007).

A proximidade espacial única do *RET* e genes pares, como o H4, na matriz nuclear das células tiroidianas, pode ser a maior razão do desenvolvimento do rearranjo *RET* após exposição à radiação ionizante (NIKIFOROVA *et al.*, 2000; RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2007, CIAMPI *et al.*, 2007). Essa proximidade espacial permite que uma simples marca de radiação possa produzir uma quebra na dupla fita de DNA em cada gene no mesmo sítio no núcleo (NIKIFOROVA *et al.*, 2000)

Há evidências de que o rearranjo *RET/PTC* leva a perda da diferenciação e do crescimento dependente de TSH, mas, para que a célula se torne totalmente transformada, há necessidade de ativação simultânea de diversos outros genes (FAGIN J.A., 2002, RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2007).

BRAF

É um gene que codifica uma kinase citoplasmática serina-treonina (RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2007; CIAMP & NIKIFOROV, 2007). Uma substituição de glutamato por valina no resíduo 600 (V600E) corresponde a mais de 90% das mutações BRAF nos carcinomas tiroidianos, mimetizam a fosforilação do segmento kinase, resultando em sinalização contínua da cascata da via MAPK e promoção da divisão celular descontrolada (RIESCO-EIZAGUIRRE & SANTISTEBAN, 2007 CIAMP & NIKIFOROV , 2007). A prevalência da mutação BRAF é estimada em 36 – 69% dos carcinomas papilíferos (RIESCO-EIZAGUIRRE G. & SANTISTEBAN P., 2007). Tanto os rearranjos *RET/PTC*

quanto as mutações BRAF têm sido demonstradas quase que exclusivamente nos CP.

A super expressão de mucinas tem sido relacionada com o mau prognóstico de diversos tumores de origem epitelial, mas ainda pouco se conhece sobre sua influência nos tumores tiroidianos.

B) MUCINAS

A superfície epitelial apical dos tratos respiratório, gastrointestinal e reprodutivo dos mamíferos é coberta por muco. Componentes mucosos são secretados pelas células epiteliais produtoras, no epitélio polarizado e pelas células secretoras nas glândulas submucosas. O muco é uma mistura de água, íons, glicoproteínas e lipídeos que promove uma barreira protetora contra patógenos e toxinas e contribui para defesa inata do sistema defensivo na imunologia mucosa (ROSE & VOYNOW, 2006; THORTON & SHEEHAN, 2004). As mucinas também promovem lubrificação de superfícies celulares, previnem a desidratação tecidual, protegem as células da degradação proteolítica, têm papel central na manutenção da homeostase e promovem a sobrevivência celular (PATEL *et al.*, 2005).

A produção de uma mucina envolve diversos processos biológicos. A síntese da mais simples mucina glicosilada madura requer transcrição de um gene MUC que codifica um RNA mensageiro (RNAm) o qual é então translacionado num esqueleto de proteína MUC e pós translacionada, modificada, em um ou várias glicosiltransferases (figura1) (ROSE & VOYNOW, 2006).

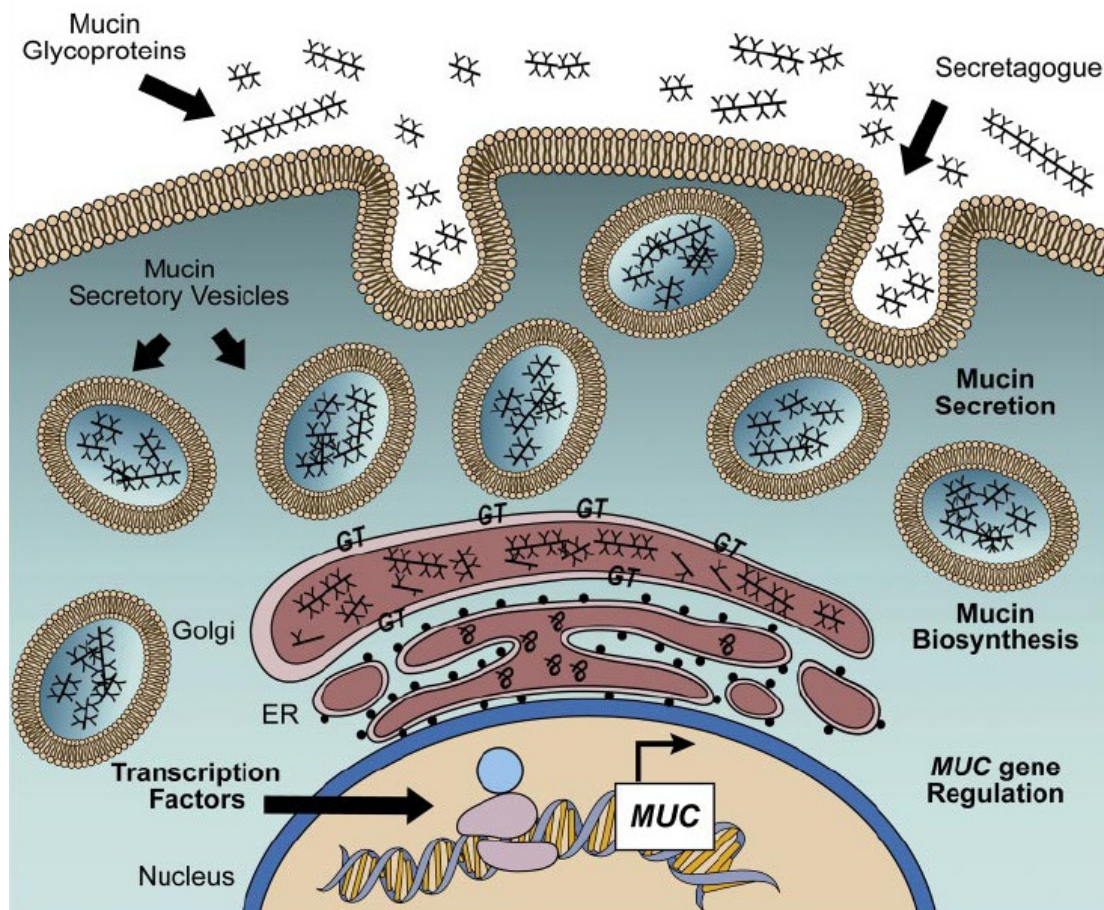


FIGURA 1. Modelo de biossíntese e secreção de mucinas glicoprotéicas numa célula globosa ou mucosa. Fatores transcricionais ativados supra regulam a expressão de genes MUC no núcleo. Os novos transcritos de MUC são translacionados às proteínas MUC nos ribossomos (•) e inseridos co-translacionados no retículo endoplasmático (RE). A O – glicosilação do esqueleto da proteína MUC é iniciada pós-translacionalmente no *cis*-Golgi, seguindo-se há a transferência de GalNAc aos aminoácidos serina ou treonina pela N-Acetilgalactosaniil peptidil transferase. A adição de GalNAc altera a conformação,

semelhante à apomucina, para uma molécula mais linear o que facilita a transferência de hexoses e ou hexosaminas para cada nascente O – glicano de um modo gradual por uma série de glicosil transferases (GT). Uma mucina é considerada madura quando está completamente glicosilada. As mucinas são então empacotadas e estocadas em grânulos secretórios até que um secretagogo dispare a secreção de mucina na superfície apical. Adaptado de ROSE M.C. & VOINOW J.A., 2006. Tradução: mucin glycoproteins= mucinas glicoprotéicas; secretagogue= secretagogos; mucin secretory vesicles= vesículas secretoras de mucinas; GT= glucosil transferases; Golgi= complexo de Golgi; ER= retículo endoplasmático; mucin biosynthesis= biossíntese de mucina; muc gene regulation= regulação do gene da mucina; transcription factors= fatores de transcrição; núcleos= núcleo.

As glicoproteínas mucinas são as maiores moléculas constituintes do epitélio mucoso e têm sido implicadas tanto em condições de saúde como de doença (ROSE & VOYNOW, 2006; THORTON & SHEEHAN, 2004; HEY *et al.*, 1994).

Existem dezoito membros de mucinas humanas que possuem domínio de repetições tandem (RT) (tabela 1 em apêndices). Adicionalmente às repetições tandem, motivos modulares estão presentes na terminação carboxi ou amino do esqueleto protéico, o que permite a classificação em **mucinas secretoras** e **mucinas ligadas à membrana** (tabela 1 – apêndice 1). (SIRAGUSA *et al.*, 2007).

B.1) MUCINA 1

É uma mucina glicoproteica atada à membrana, expressa na superfície celular de numerosos tecidos epiteliais assim como em tecidos hematopoiéticos (BROSSART P., *et al*, 2001). Associada à superfície celular, a mucina 1 (*MUC1*) está ligada às células por um domínio transmembrana e tem uma cauda citoplasmática curta que se associa a elementos do cito esqueleto e à proteínas adaptadoras citosólicas que participam do sinal de transdução (PATEL *et al.*, 2005; GAEMERS *et al.*, 2001). *MUC1* pode servir como receptor, sensor de superfície celular e conduzir sinais em resposta a estímulos externos que levam a coordenação de respostas celulares que inclui a proliferação, diferenciação, apoptose, ou a secreção de produtos celulares específicos (PATEL *et al.*, 2005). As células cancerígenas podem utilizar as mucinas do mesmo modo que as células epiteliais normais para protegê-las de condições adversas de crescimento e controle local do micro ambiente durante a invasão e metástases. (PATEL *et al.*, 2005; SIRAGUSA 2007). *MUC1* tem sido caracterizada como uma oncoproteína que causa transformação celular que resulta de crescimento independente de ancoragem e formação tumoral (PATEL K., *et al*, 2005, MAGRO G., *et al*, 2003).

A mucina 1 está super expressa e glicosilada de modo aberrante em praticamente todos os adenocarcinomas, o que inclui mais de 90% dos carcinomas: de mama, ovário, pâncreas, colo-retal, pulmão, próstata e de estômago (RAHN J., *et al*, 2004, PATEL K., *et al*, 2005; MAGRO G., *et al*, 2003). *MUC1* também está expressa em tumores não epiteliais como astrocitomas, melanomas, neuroblastomas, mieloma múltiplo e linfoma não Hodking (BROSSART *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2005) o que representa mais de 50% de

todos os tumores malignos dos humanos (PATEL *et al.*, 2005). Nos tecidos normais *MUC1* está altamente glicosilada (como em toda mucina), fato que esconde peptídeos antigênicos que poderiam servir como alvos tumorais (KAM *et al.*, 1998). No tecido neoplásico a subglicosilação de *MUC1* pode revelar epítomos e permitir que o sistema imune acesse o seu core protéico ativando a cascata imune contra às células neoplásicas (RAHN *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005; SIRAGUSA *et al.*, 2007).

Apesar da *MUC1* ser expressa na maior parte do epitélio glandular, a glicosilação do core protéico pode variar intrinsecamente em diferentes células, resultando em diferentes perfis de produtos finais de mucina (SIRAGUSA *et al.*, 2007). Nas células normais *MUC1* tem localização na superfície apical, mas nas células cancerígenas perde a polaridade e é encontrada em níveis elevados no citosol e em toda a membrana celular (WREESMAN *et al.*, 2004). *MUC1* também está relacionada com adesão celular manutenção da polaridade celular e modulação imune (LUGLI *et al.*, 2007). Demonstrou-se que o domínio extracelular de *MUC1* atua como ligante para moléculas-1 de adesão celular e seletinas. A redistribuição da expressão de *MUC1* por toda a superfície celular impede outras moléculas de superfície celular de atuar em seus ligantes e interfere na adesão à matriz extracelular mediada por integrinas e com as caderinas que mediam a adesão celular célula-a-célula, a perda da E-caderina, que é considerada a maior molécula epitelial de adesão celular, célula-a-célula, contribui para a promoção da invasão e metástases (RAHN J., *et al.*, 2004, PATEL K., *et al.*, 2005; KOHLGRAF K., *et al.*, 2003; BROSSART *et al.*, 2001).

Existem evidências que sugerem que a *MUC1* também pode contribuir para a regulação da diferenciação e proliferação de células tumorais. A cauda citoplasmática de *MUC1* pode se ligar e sinalizar através da β -catenina e da ativação de vias proteino-kinases. Um fragmento da cauda citoplasmática pode ser transportado ao núcleo e em associação com a β -catenina pode aumentar a possibilidade de *MUC1* poder influenciar diretamente co-ativadores transcricionais da β -catenina e regular diversos genes relacionados à proliferação e diferenciação celular (BARUCH *et al.*, 1999). Portanto, a cauda citoplasmática de *MUC1* (representa a porção carboxil da proteína *MUC1*) demonstrou promover o fenótipo de malignidade por ser transportada ao núcleo em associação com a β -catenina. (RAHN *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005; BARUCH *et al.*, 1999). A interação da cauda citoplasmática de *MUC1* e o adaptador protéico Grb2 corroboram a noção de que proteínas *MUC1* estão envolvidas na sinalização celular e podem recrutar a β -catenina regulando sua função (BARUCH *et al.*, 1999).

A supra regulação de *MUC1* também protege as células tumorais do reconhecimento e destruição pelo sistema imune, pois inibe a proliferação das células T humanas, contribuindo para a propagação da imunossupressão causada pelo câncer. O aumento da expressão de *MUC1* promove dissociação celular e progressão oncogênica. (RAHN *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005; SIRAGUSA *et al.*, 2007; MAGRO *et al.*, 2003).

TARP *et al.*, 2007 identificou que a região GSTA correspondente ao da repetição em tandem do gene *MUC1*, contém um epítipo altamente imuno

dominante quando presente concomitante com *O*-glicanos pequenos e imaturos, geralmente presentes em células cancerígenas. Esse epítopo glicopeptídeo da repetição em tandem de *MUC1* é estritamente dependente de um aspecto específico de glicosilação Tn/STn com padrão de expressão marcadamente específico do câncer. A expressão específica no câncer desse epítopo glicopeptídeo o faz como um candidato primário para mensurações imunodiagnósticas e terapêuticas.

MUC1 pode inibir a resposta apoptótica p53 dependente, mas sabe-se que essa inibição pode ocorrer por diferentes mecanismos e está relacionada com o contexto celular apresentado. (PATEL K., *et al*,2005)

B.2) MUCINA 1 E A SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER DE TIRÓIDE

O interesse pela participação e *MUC1* na patogênese dos tumores tireoidianos remonta aos estudos de UCCHEDDU em extratos de tiróide nos anos 50. Mais recentemente, WREESMANN *et al.*, 2004, sugeriu que *MUC1* seria um marcador de prognóstico do CP da tiróide. Nesse estudo, WREESMAN encontrou super expressão de *MUC1* apenas nos CP com comportamento mais agressivo (células altas) em contraste com a pequena expressão de *MUC1* nos CP clássicos e não expressão em tiróide normal.

A observação que o RNAm de *MUC1* estava expresso em todas as células, incluindo células de bócio, analisadas por SIRAGUSA *et al.*, 2007 , sugere que a formação de *MUC1*-COOH (cauda citoplasmática de *MUC1*) nas células tireoidianas tumorais seja um evento pós translacional mais ativo nas células de tumores mais agressivos. *MUC1*-COOH estava expresso na membrana celular de

ambos, bócio e células cancerígenas, mas a localização mitocondrial aberrante (que parece estar relacionada com a refratariedade de apoptose das células cancerígenas tiroidianas, com diminuição do citocromo *c* e conseqüente redução da caspase e apoptose) somente ocorreu nas células dos CP e indiferenciados (SIRAGUSA *et al.*, 2007, BARUCH *et al.*, 1999).

A refratariedade de células cancerígenas da tiróide de responderem a agentes quimioterápicos e de evoluírem à apoptose é geralmente conseqüente a ativação de vias e fatores anti – apoptóticos como o que acontece com a produção autócrina de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) pelas células cancerígenas da tiróide, levando a transcrição do gene *MUC1* e à expressão de diversos fatores anti-apoptóticos, o que nos leva a observar que as células neoplásicas tiroidianas necessitam de *MUC1* para sua viabilidade (SIRAGUSA *et al.*, 2007).

BAEK *et al.*, 2007, encontrou a expressão de m-RNA de *MUC1* em tiróide normal, CP e adenoma folicular (AF). Observou que não havia diferenças de expressão entre CP e AF. Todavia, ao avaliar a expressão através da técnica de imunoistoquímica, os CP's apresentavam expressão e o tecido normal e AF não. Observou também que a expressão de *MUC1* estava relacionada com o tamanho do tumor, extensão extra-tiroidiana e a classificação TNM.

As propriedades anti-adesivas de *MUC1* podem ter papel importante na transformação maligna e comportamento mais agressivo de tumores malignos de origem epitelial, pode ter sua importância no crescimento tumoral, progressão e disseminação metastática e pode estar relacionado com a transformação maligna

de células tiroideas e com o prognóstico do CP (BAEK *et al.*, 2007; WREESMAN *et al.*, 2004).

Essas múltiplas propriedades de *MUC1* as fazem um alvo terapêutico atraente. A exposição de células cancerígenas tiroideas aos anticorpos anti – *MUC1* potencialmente protege essas células contra a progressão tumoral e metástases pela ligação dos anticorpos às células tumorais que expressam *MUC1* (KAM *et al.*, 1998; HENDERIKX *et al.*, 2002; RAHN *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005). O tratamento com anticorpos contra essas células pode bloquear alguns sinais intracelulares anti-apoptóticos, restaurando a função normal do ciclo celular e morte. (HENDERIKX *et al.*, 2002; RAHN *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005).

DWYER R., *et al.*, 2005, utilizou o promotor do gene *MUC1* para direcionar a expressão de NIS em células de câncer de mama através de transfecção por vírus, possibilitando a captação de I_{131} por essas células, sugerindo que *MUC1* também poderia servir como possibilidade terapêutica no câncer.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Avaliar a relação da expressão do gene *MUC1* no prognóstico de pacientes portadores de Carcinoma Papilífero da Tiróide.
- Correlacionar os achados da expressão do gene *MUC1* com aspectos clínicos, anatomo-patológicos e de evolução dos pacientes com carcinoma papilífero da tiróide.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.CASUÍSTICA

Foram selecionados para este estudo 150 pacientes (tabela 2) portadores de carcinoma papilífero da tiróide. 57 indivíduos foram atendidos no Ambulatório de Câncer da Tiróide sob coordenação da Prof. Dra. Ligia Vera Montalli da Assumpção, Disciplina de Endocrinologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, durante os anos de 1995 a 2008, com mediana de seguimento de 67 meses e média de 73,29(\pm 39,83) meses. Os demais 93 pacientes fazem parte do ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital AC Camargo - Fundação Antônio Prudente em São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski. Estes pacientes foram atendidos de 1998 a 2008, e seguidos por 41,37(32,5 \pm 34,30 meses). Os pacientes concordaram em participar deste estudo e assinaram o Termo de Consentimento Informado, conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/ Unicamp e do Hospital AC Camargo.

Foram obtidos dados dos prontuários dos pacientes, de ambos os serviços (HC-Unicamp e AC Camargo), incluindo, além dos dados de identificação, a idade ao diagnóstico; sexo; cor; dados clínicos pré-cirúrgicos; uso ou não de cigarro; história de câncer na família; história de segundo câncer ou de câncer prévio; exames realizados (ultra-sonografia, citologia obtida através de biópsia aspirativa), dados referentes à cirurgia e dados do exame anatomo-patológico (medida do tumor; tipo histológico segundo classificação da Organização Mundial de Saúde: HEDINGER & SOBIN, 1988; grau de diferenciação; presença ou não de cápsula; presença ou não de múltiplos focos; presença ou não de invasão peritumoral, capsular, vascular, extra tireoidiana; presença ou não de tiroidite

peritumoral ou no restante da glândula; presença de linfonodos acometidos pelo tumor).

Tabela 2. Características Clínicas dos Pacientes

	Número de pacientes	%
Total	150	100
Feminino/Masculino	122/28	81,3/18,7
Idade (<45 e >45)	86/64	57,3/42,7
Cor (branco/não branco)	129/21	86/14
Tabagismo (sim/não)	39/87	31/69
Seguimento:UNICAMP/HCâncer (média±DP meses)	73,29(±39,83)/41,37(32,5±34,30)	
Tiroidectomia total	148	98,6
Radiodo (média±DP mCi)	202,8±165,38	
Tempo livre-doença (média±DP meses)	24,26±29,84	
Estadio		
1	35	23,4
2	30	20,13
3	84	56,4
Metástases ao diagnóstico (sim/não)	62/87	41,6/58,4
Metástases na evolução (sim/não)	46/104	30,7/69,3
Segundo câncer	12	13,33
Morte pelo tumor	7	4,7

Os pacientes incluídos neste estudo não apresentavam, a princípio, história de exposição acidental ou médica à radiação ionizante. Todos os dados, incluindo os diagnósticos de outras patologias concomitantes, foram confirmados nos prontuários dos pacientes.

Os pacientes foram submetidos à tiroidectomia total ou quase total. Os com diagnóstico pré-operatório de nódulos metastáticos no pescoço ou nos quais gânglios suspeitos foram visualmente identificados no intra-operatório foram submetidos à dissecação regional do pescoço.

Depois de quatro a seis semanas da cirurgia sem reposição de levotiroxina, os pacientes foram submetidos à pesquisa de corpo inteiro (PCI) com 5 mCi de ^{131}I para a detecção de restos ou de metástases do carcinoma e dosagem de Tireoglobulina (Tg). A quase totalidade dos pacientes recebeu dose ablativa de 100 mCi de radiodo ^{131}I , após a qual foi realizada nova PCI. Em seguida, foram prescritas doses supressivas de levotiroxina. Os pacientes são seguidos com exames periódicos para a detecção precoce de metástases, TSH sérico e Tg de acordo com um protocolo que inclui raios-X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada e outros eventuais métodos de imagem para a detecção de metástases à distância. Ver tabelas 2 e 3 com um resumo das características dos pacientes.

Cerca de um ano após a cirurgia, os pacientes são submetidos a uma nova PCI, desta vez após suspensão da levotiroxina, acompanhada de nova dosagem de Tg e TSH. Na suspeita de qualquer lesão recidivante ou na presença

de níveis de Tg sérica elevados (>2mg/dl), os pacientes são amplamente investigados por meio dos métodos de imagem que forem mais apropriados de acordo com a suspeita clínica.

Tabela 3. Características Tumorais dos Pacientes

	Número de pacientes	%
CP Clássico	94	62,6
CP C Altas	13	8,6
CPVF	39	26
Outros	4	2,6
Tiroidite (sim/não)	48/100	32,4/67,6
Multifocal (sim/não)	66/84	44/56
Invasão (sim/não)	47/77	37,9/62,1
Cápsula (sim/não)	24/47	33,8/66,2
Tamanho		
< 2cm	85	57,4
2 a 4 cm	38	25,7
>4 cm	25	16,9

Definiu-se a evolução como "livre de doença" em indivíduos que mantêm níveis de Tg abaixo de 2 ng/dL e não possui qualquer evidência de recorrência, clínica ou por métodos de imagem, enquanto os pacientes com recorrência são divididos naqueles com recorrência local, quando se detectam restos tireoidianos ou recidivas no leito tireoidiano ou gânglios cervicais, e naqueles com a presença de metástases à distância.

Para fim de análise estatística, os pacientes que evoluíram com recidiva local ou à distância ou morreram durante o acompanhamento foram classificados como de má evolução.

O sistema TNM (tabela 4 – apêndice 2) foi utilizado para se classificar cada paciente enquanto que o estadio utilizado foi o do consenso brasileiro de nódulos e câncer diferenciado de tiróide publicado em 2007 (MAIA, *et al*, 2007) (tabela 5- apêndice 3).

4.MÉTODOS

Os tumores de 146 pacientes foram emblocados em parafina e, em seguida, cortes de 4µm de espessura foram usados para exame em lâminas previamente tratadas. Estas foram lavadas em água corrente, em seguida deixadas no álcool absoluto, foram imersas duas vezes em acetona por 1 minuto, depois passaram por uma solução de acetona (750 ml) com silano (30 ml), novamente colocadas em acetona pura e foram deixadas na estufa 110°C durante uma hora para fixação das secções. Em seguida, foram retiradas e mantidas à temperatura ambiente por uma hora até o momento da reação. A reação de imunoperoxidase foi realizada no Laboratório de Patologia Experimental – CAISM – Unicamp.

4.A) Iunoistoquímica

4.A.1) Tissue Array

Regiões representativas dos tumores foram identificadas e marcadas nas lâminas coradas com Hematoxilina – Eosina e subseqüentemente identificadas nos blocos correspondentes. Cilindros de 1 µm do tecido foram feitos das áreas marcadas de cada bloco e incorporadas dentro de um recipiente com bloco de parafina usando um instrumento de precisão denominado de “tissue arrayer” (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) Todas as amostras foram duplicadas, usando-se cópias de 1 µm para se garantir adequada amostragem.

4.A.2) Reação de Imunoperoxidase

Os cortes foram desparafinados em banho de xilol a 110°C e, a seguir, banhos subseqüentes em xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80%, 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de água oxigenada a 10 volumes cada um, com duração de três minutos, seguidas de lavagem em PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 a 7,6). Para a recuperação antigênica foi utilizada panela a vapor T-fall^R (França), com o objetivo de desmascarar antígenos. Na panela as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio (10mM) pH 6,0 a 95°C TA 1mM) pH 8,9 (p53), durante 30 minutos. A seguir foram lavadas em água corrente. Após esta etapa, os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico a

4°C, durante a noite. Após a incubação, as lâminas foram passadas por três lavagens em PBS sob agitação e incubadas com Novolink Max Polymers por 1 hora (Novocastra Laboratories LTD, New Castle, UK). A seguir, três lavagens em PBS com agitação. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (3-3' – diaminobenzidine tetrahydrochloride, SIGMA (St. Louis – US - código D5637) com uma solução de 1500 µl H²O² (10 volumes) e 1 µl DMSO (dimethylsulfoxide) a 37°C, durante 5 minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra coradas com hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizados em três banhos de xilol e a seguir montadas com lamínulas e resina Entellan (Merck 1079610100). Para atestar a positividade da reação imunoistoquímica, foram usados controles sabidamente positivo. Para *MUC1* o controle positivo foi obtido de um carcinoma de mama. O controle negativo foi obtido dos mesmos blocos usados no controle positivo com a supressão do anticorpo primário.

O anticorpo monoclonal utilizado no estudo foi o anticorpo anti *MUC1* anti-humano de rato, VU4H5: SC – 7313, na diluição de 1:700, Santa Cruz, California – USA, a proteína *MUC1* tem entre 160 a 230 kDa.

4.A.3) Leitura dos Resultados

Foi realizada em microscópio óptico comum, no aumento de 40 vezes pela autora e revista por um único médico Patologista, de modo semi-objetivo,

examinando-se todos os campos de todos os fragmentos do tumor. Foram fotografados os campos das lâminas onde se observou maior positividade “hot spot” (4 fotos cada). As lâminas foram fotografadas em uma câmera Canon modelo Power Shot G5 de 5 mega pixels. O microscópio utilizado foi modelo Axiophot da marca Zeiss em um aumento de 40x (objetiva).

Foram considerados positivos para *MUC1* todos os citoplasmas corados: I (25% das células positivas); II (de 25 a 50% das células positivas); III (de 50 a 75% das células positivas coradas); IV (de 75 a 100% das células positivas). A intensidade da coloração foi graduada em categorias: negativa e positiva: fraca (1), moderada (2) e forte (3) (figuras 4 e 5). A soma da intensidade com o do número de células coradas foi utilizada em um índice de comparação entre os casos, com valores de 2 a 7, como por exemplo: positivo I e intensidade fraca (1), a soma resultou no índice igual a 2 e assim sucessivamente.

4.B) PCR em Tempo Real

4.B.1) Extração de RNA

Os tecidos de 75 pacientes utilizados neste estudo foram obtidos durante a cirurgia de tireoidectomia. Os tecidos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer - 80°C. O tecido foi macerado com o Politron®, em nitrogênio líquido, sem deixar o tecido descongelar. Para cada 50 a 100 MG de tecido foi adicionado 1 ml de Trizol® (Invitrogen, lot n°50300415, Carlsbad, CA, USA) e este preparado foi incubado por cinco minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 0,2 ml de Clorofórmio para cada 1 ml de

Trizol®. Após agitação por 15 minutos, a solução foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente e então, centrifugada por 15 minutos a 4°C (10.500 RPM), após, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O RNA foi precipitado com 0,5 ml de Álcool Isopropanol para cada 1 ml de Trizol® usado no início da reação e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Fez-se nova centrifugação a 4°C (10.500 RPM) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet do RNA lavado com etanol 75% gelado (-20°C) na quantidade de 1 ml para cada 1 ml de Trizol® usado no início. Homogeneizou-se e centrifugou-se a 4°C (8.400 RPM) por 10 minutos. O etanol foi descartado e o pellet secou em temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em água DEPC (livre de RNase) e colocado em banho seco a 55°C por 10 minutos.

Figura 2. Imunoistoquímica para *MUC1* demonstrando negatividade

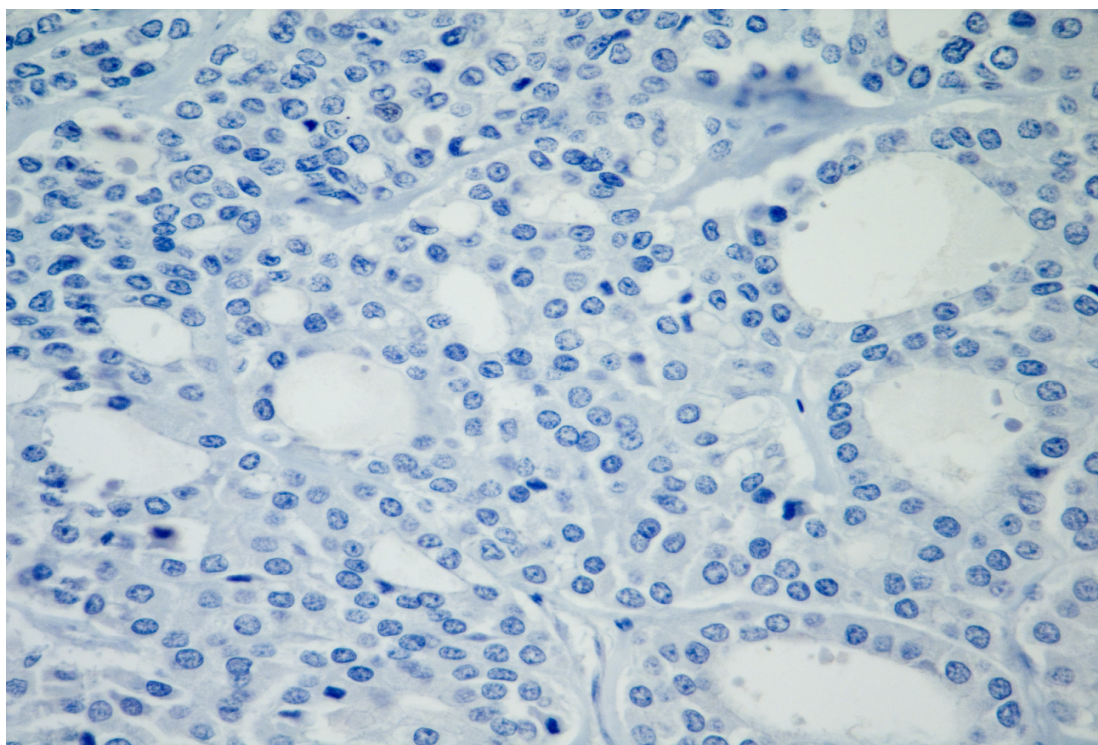
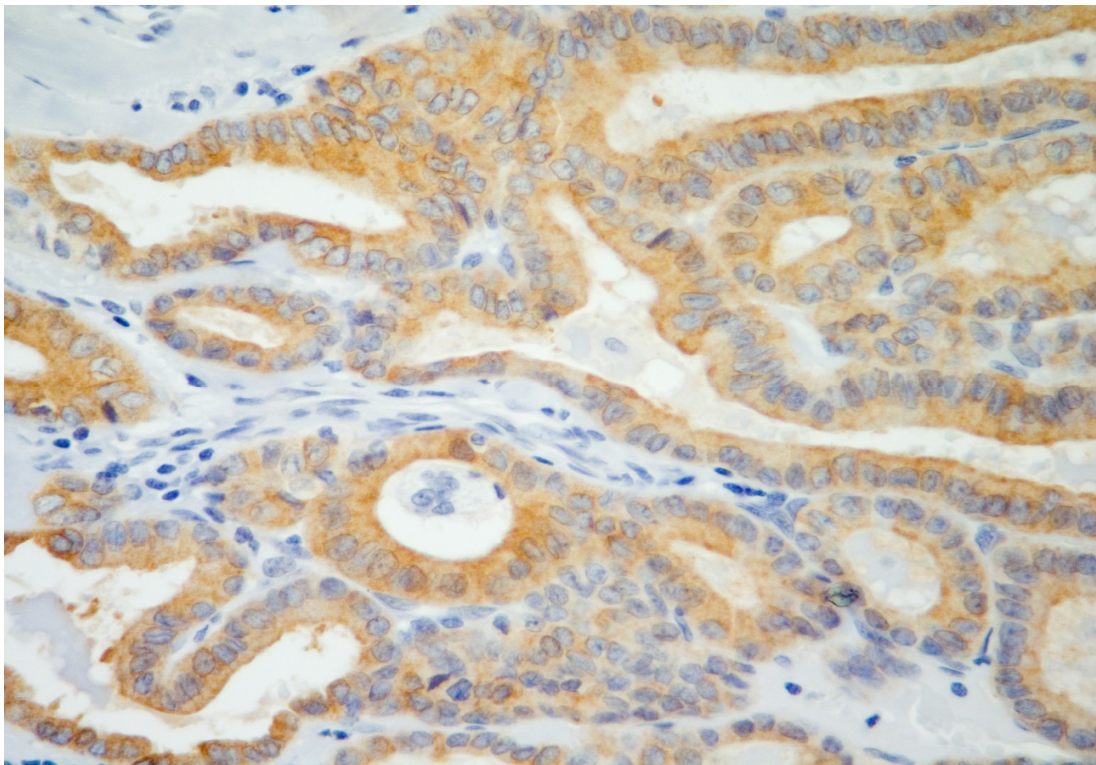


Figura 3. Imunoistoquímica com positividade 4, forte intensidade para *MUC1*



4.B.2) Síntese de cDNA

A transcrição reversa foi feita com o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen®), o qual continha primers randomizados que iniciavam a seqüência. A quantidade de RNA colocada no início da reação depende da razão; para verificar a quantidade de RNA (nano gramas) utilizamos a fórmula $(A_{260} \times \text{fator RNA} [=40] \times \text{fator de diluição} [=70] / 100)$ para transformar em $\mu\text{g/ ml}$ (Gene Quanti Pro Amersham Biosciences).

4.B.3) Quantificação Por Real Time PCR

Para a reação de PCR em tempo real utilizou-se o reagente Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen do Brasil), que possui a capacidade de se intercalar entre as fitas de DNA. Desta maneira, a expressão gênica é calculada através da quantidade de fluorescência emitida em cada reação. Foram utilizados 25 ng de cDNA, em uma reação com volume final de 25 µl contendo 12.5 µl de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG e 10 µM de cada par de *primers*. Os *primers* (MWG Oligo Synthesis Report, Miami, USA) utilizados para esta análise foram desenhados pelo programa *Primer express* (Applied Biosystems), baseados em seqüência dos genes de interesse, disponíveis no banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Os *primers* escolhidos para *MUC1* foram:

Sense: 5'ACA ATT GAC TCT GGC CTT CC 3'

Anti-Sense: 5'CAG GTT ATA TCG AGA GGC TGC T 3'

Como controle interno da reação, *primers* para amplificação do gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Invitrogen Custom Primers) foram utilizados:

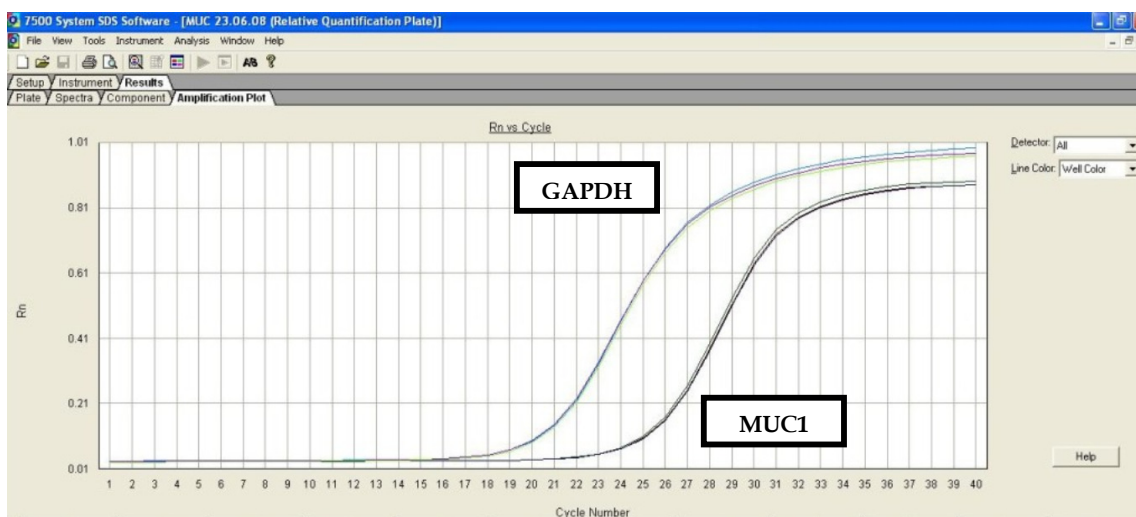
Sense: 5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'

Anti-Sense: 5' GAA GAT GGT GAT GGG ATT 3'

A reação de PCR foi realizada em aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Lincoln Centre Drive, Foster City, USA) nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15

segundos (40 vezes) e 60°C por 1 minuto. Os resultados das reações de PCR foram analisados pelo programa 7500 System SDS Software. Neste programa, a expressão gênica foi calculada a partir do número de ciclos necessários (*CrossThreshold - Threshold cycle*) para que a fluorescência emitida atinja um valor inicial para cada gene (*CT Threshold cycle value*). Este valor foi estipulado como 3 para o gene analisado (Figura4).

Figura 4. Figura demonstrativa dos dados gerados por PCR em tempo real. No gráfico, mostramos as curvas do gene *MUC1* e do controle endógeno GAPDH.



A quantificação do RNAm de *MUC1* e GAPDH foi realizada sob condições ótimas. Os coeficientes de variação inter e intra – análise foram de 1% e 1%, respectivamente, calculados por 5 diferentes concentrações da curva padrão. A baixa variabilidade inter e intra – análise demonstrou que a RT – PCR pode ser realizada com elevada reprodutibilidade. Os controles negativos não demonstraram produtos de PCR mesmo após 40 ciclos, comprovando a ausência de contaminantes na reação da placa.

4.C) METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Análise descritiva com apresentação de tabelas de freqüências para variáveis categóricas. Para verificar associação ou comparar proporções foi utilizado o teste X^2 ou teste Exato de Fisher, quando necessário. Para identificar possíveis riscos para a conclusão clínica, invasão e tireoidite foi utilizada a análise de regressão logística múltipla. As distribuições do tempo livre de doença foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações pelos testes de Breslow ou Log Rank, quando necessário. Análise descritiva com apresentação de tabelas de freqüências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas. Para comparação de medidas contínuas ou ordenáveis entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney e entre três ou mais grupos o teste de Kruskal-Wallis. Para verificar associação linear entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente varia de -1 a 1. Valores próximos dos dois extremos indicam correlação negativa ou positiva, respectivamente e valores próximos de zero não indicam correlação. Para identificar possíveis riscos de evolução, agressividade e conclusão clínica foi utilizada a análise de regressão logística múltipla.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

4.C.1) Programas Computacionais

SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3 Service Pack 3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA. SPSS for Windows, versão 10.0. SPSS Inc, 1989-1999, Chicago, Illinois, USA.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.A) AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *MUC1*

1. *MUC1* POR IMUNOISTOQUÍMICA

Ver resumo dos dados de imunistoquímica nas Tabelas 10 e 11 – Apêndices 8 e 9.

- **Análise da *MUC1* sua relação com evolução**

A análise por imunistoquímica foi realizada em 146 pacientes. A avaliação realizada comparou a evolução clínica dos pacientes (livre de doença e má evolução) com os diversos graus de positividade de células para *MUC1* (I, II, III e IV), os diferentes graus de intensidade de coloração (1,2,3) e o índice da soma da intensidade com a positividade (2 a 7) e não se encontrou diferenças estatísticas (Fisher, X^2).

A Análise de regressão logística múltipla ajustada para sexo, faixa etária e tabagismo, realizada para a intensidade de positividade para *MUC1*, não apresentou diferenças estatísticas ($p = 0,07707$).

- **Análise da *MUC1* sua relação com a Invasão Tumoral**

A avaliação realizada comparou a presença ou ausência de invasão tumoral demonstrada no laudo do anatomo-patológico com os diversos graus de positividade de células para *MUC1* (I, II, III e IV), os diferentes graus de intensidade de coloração (1,2,3) e o índice da soma da intensidade com a positividade (2 a 7) e não encontrou diferenças estatísticas (Fisher, X^2).

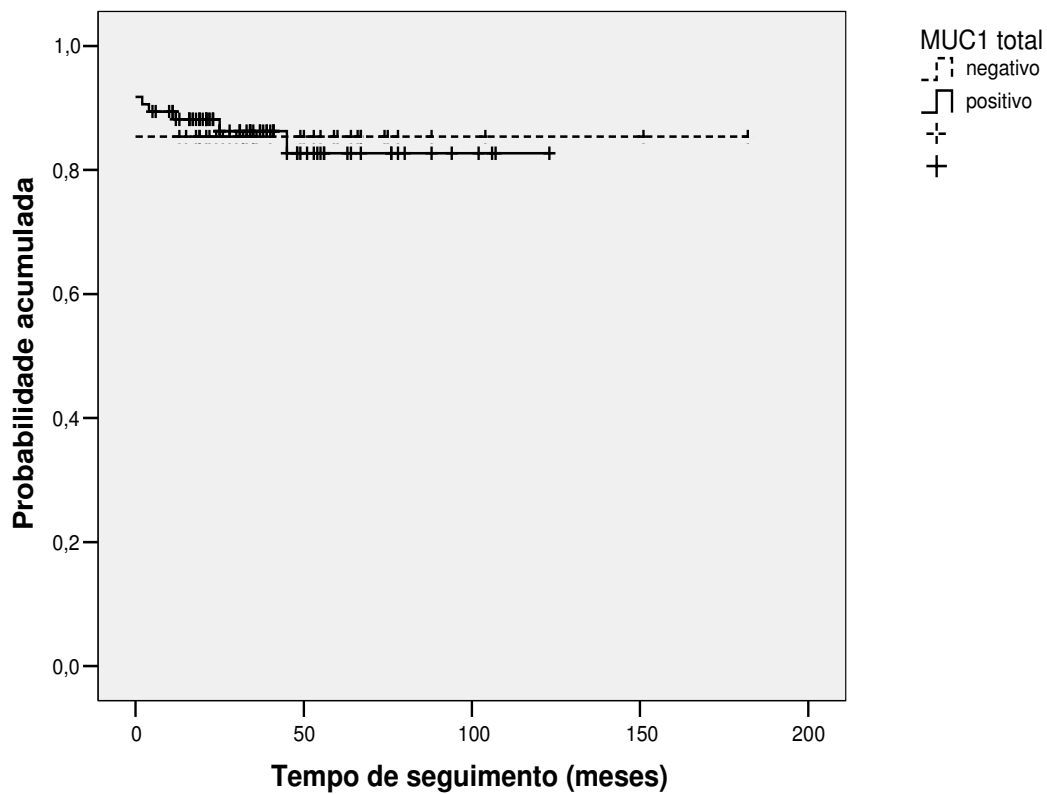
- **Análise da *MUC1* e sua relação com a morte pelo tumor**

Os indivíduos que evoluíram a óbito foram 7. Não houve correlação entre as mortes causadas pelo tumor e a imuno- expressão de *MUC1*.

- **Análise da *MUC1* e sua relação com o tempo livre de doença**

A expressão de *MUC1* não influenciou o tempo livre de doença (Breslow; p valor = 0,742). (figura 8).

Figura 5. Curva de Kaplan-Meier para o tempo livre de doença entre *MUC1* total positivo ou negativo



2. ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL DE *MUC1*

Ver resumo dos dados em Tabela 12 – Apêndice 10.

2.1) QUANTIFICAÇÃO DO RNAm DE *MUC1*

A quantificação de *MUC1* foi realizada em 75 tecidos de pacientes portadores de carcinoma papilíferos oriundos do Hospital do Câncer. Os pacientes analisados 63 eram do sexo feminino e 12 do sexo masculino, 49,33% (n=37) apresentavam idade superior ou igual a 45 anos e 46,66% (n=35) com idade ao diagnóstico inferior a 45 anos. A mediana de idade foi 44 (43,26±12,9). 68% (n=51) apresentavam carcinoma papilífero clássico (CPC) e 32% de carcinoma papilífero variante folicular (n=24) (CPVF). Nestes mesmos casos foi realizada a análise por imunohistoquímica de *MUC1* daquele hospital.

A mediana do RQ de *MUC1* foi 3,12 (3,9017 ±3,22) moléculas/μg RNA. Foi considerada para a análise estatística a expressão de *MUC1* RQ > 3 e < 3. Consideramos a expressão < 3 como menos expresso e > 3 como mais expresso. A mediana dos que apresentaram expressão < 3 foi de 1,32 (1,38±0,69) e dos com expressão > 3 foi 5,87 (6,31±2,86).

- **Análise da *MUC1* e sua relação com os dados clínicos dos pacientes**

- ✓ **SEXO**

MUC1 > 3 estava presente em 45,33% (n=34) das mulheres e em 5,33% (n=4) dos homens. No sexo feminino a expressão de *MUC1* < 3 estava presente em 38,6% (n=29) das mulheres e em 10,66% (n=8) dos homens. Essa análise não apresentou diferenças estatísticas (Fisher; p=0,223).

✓ IDADE

A expressão de *MUC1* > 3 em 24% (n=18) dos com idade < 45 e em 26,66% (n=20) dos com idade ≥ 45 anos. A expressão de *MUC1* < 3 estava presente em 28% (n=21) dos pacientes com idade < 45 anos e em 21,33% (n=16) dos com idade ≥ 45 anos. (Fisher; p=0,4910).

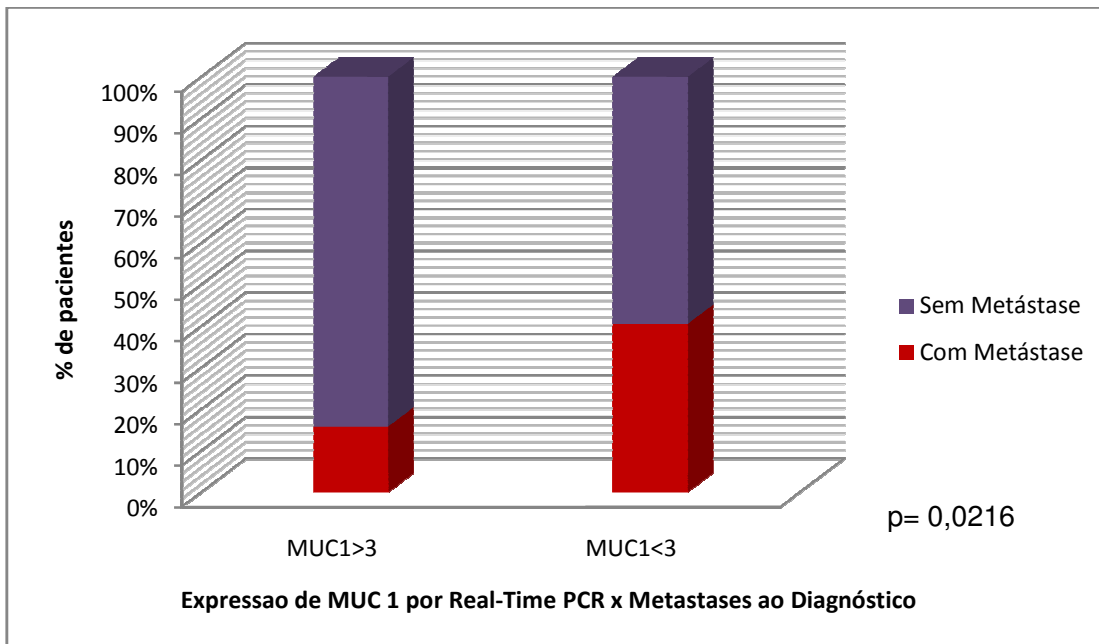
✓ ESTADIO

. A expressão de *MUC1* > 3 em 18% (n=14) no estadio 1, 13,33% (n=10) no estadio 2 e 18% (n=14) no estadio 3. A expressão < 3 estava presente em 16% (n=12) dos pacientes com estadio 1, em 8% (n=6) no estadio 2 e em 25,33% (n=19) no estadio 3 (Fisher; p=0,353).

✓ METÁSTASES AO DIAGNÓSTICO

A expressão de *MUC1* > 3 ocorreu em 8% (n=6) dos pacientes com metástases ao diagnóstico e em 42,6% (n= 32) dos sem metástases ao diagnóstico. *MUC1* < 3 estava presente em 20%(n=15) dos pacientes com metástases ao diagnóstico e em 29,3% (n=22) dos sem metástases ao diagnóstico. Essa análise apresentou diferenças estatísticas (Fisher; p=0,0216) (gráfico 1).

GRÁFICO 1 Relação entre a expressão do gene *MUC1* por Real-Time PCR e a presença de metástases no diagnóstico.



✓ METÁSTASES NA EVOLUÇÃO

A expressão > 3 em 4,41% (n=3) dos com metástases e em 44,11% (n=30) dos que não apresentavam metástases e a expressão de *MUC1* < 3 estava presente em 7,35% (n=5) dos pacientes com metástases na evolução e em 44,11% (n=30) dos que não apresentavam metástases e a (Fisher; p=0,7102).

- **Análise da *MUC1* sua relação com os dados do tumor**

✓ DIAGNÓSTICO ANATOMO-PATOLÓGICO

Dos 75 pacientes analisados, 51 (68%) eram portadores de CPC e 24 (32%) de CPVF. A expressão >3 estava presente em 29,33% (n=22) dos com CPC e em 21,33% (n=16) dos com CPVF e a expressão de *MUC1* < 3 estava presente em 38,66% (n=29) dos indivíduos com CPC e em 10,66% (n=8) dos com CPVF enquanto que a (Fisher; p=0,0830).

✓ **MULTIFOCALIDADE**

A expressão > 3 ocorreu em 13,33% (n=10) dos com múltiplos focos e em 37,33% (n=28) dos tumores únicos e a expressão de *MUC1* < 3 estava presente em 17,33% (n=13) dos pacientes com múltiplos focos e em 32% (n=24) dos com tumores únicos (Fisher; p=0,4596).

✓ **INVASÃO**

A expressão de *MUC1* > 3 estava presente em 22,6% (n=17) dos com invasão tumoral e em 28% (n=21) dos sem invasão e foi < 3 em 32% (n=24) dos com invasão tumoral e em 17,3% (n=13) dos indivíduos sem invasão (Fisher; p=0,1057).

✓ **TIROIDITE**

Dos 75 pacientes, 32 (42,66%) apresentavam tiroidite no AP. Nos que possuíam expressão > 3 , 26,66% (n=20) apresentavam tiroidite e 24% (n=18) não a apresentavam. A expressão de *MUC1* < 3 estava presente em 16% (n=12) dos

que apresentavam tiroidite e em 33,33% (n=25) dos que não a apresentavam. (Fisher; p=0,1032).

✓ TAMANHO DO TUMOR

A avaliação realizada revelou que 73% (n=55) apresentavam tumores < 2 cm, 21,3% (n=16) de 2 a 4 cm e em 5,3% os tumores eram > 4 cm. A expressão >3 ocorreu em 38,6% (n=29) dos com tumores < 2 cm, em 9,3% (n=7) dos com tumores de 2 a 4 cm, e em 2,66% (n=2) nos com tumores >4cm. A expressão de *MUC1* < 3 estava presente em 34,66% (n=26) dos com tumores < 2 cm, 12% (n=9) dos tumores de 2 a 4cm e em 2,66% (n=2) dos tumores > 4 cm (Fisher; p=0,6380).

- ***MUC1* por Imunoistoquímica e a relação com a expressão por Real Time – PCR:**

A expressão de *MUC1* por RT-PCR > ou < 3 quando comparada com a expressão por imunoistoquímica, não demonstrou significância estatística. As comparações que realizamos foram:

- ✓ Entre os indivíduos positivos e negativos na imunoistoquímica de *MUC1* (Fisher; p=0,2911).
- ✓ Entre os indivíduos com positividade 4 e demais graus de positividade (X^2 ; p=0,8037).

- ✓ Entre os indivíduos com positividade 3 e 4 e nos com positividade 1 e 2 (Fisher; $p=0,8037$).
- ✓ Entre a soma da positividade com a intensidade (X^2 ; $p=0,4424$).

5.B) AVALIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA

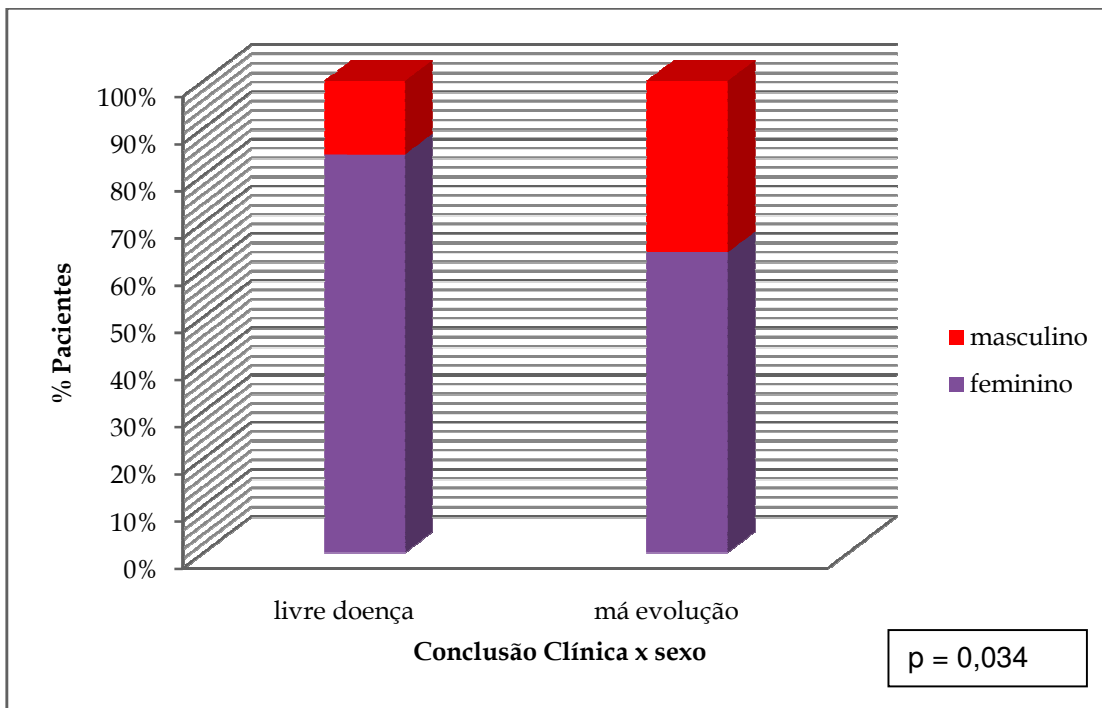
Dos pacientes avaliados 128 (85,23%) apresentavam-se livres da doença e 22 (14,77%) tiveram uma má evolução. Ver resumo dos dados clínicos em Tabela 6 – Apêndice 4

1. DADOS CLÍNICOS

✓ SEXO

Os homens apresentaram uma evolução clínica pior que as mulheres, comparativamente. Entre os pacientes considerados como livres de doença, 72% do total ($n=108$) eram mulheres contra 13,30% ($n=20$) de homens. Entre os pacientes com má evolução, os homens representavam 5,33% do total ($n=8$) e foram comparados com as mulheres (9,33% $n=14$) Nesta análise houve diferenças estatísticas (Fisher; $p=0,034$) (gráfico 2).

GRÁFICO 2. Relação entre o sexo masculino e feminino e conclusão clínica



✓ ETNIA

A miscigenação racial no Brasil é preponderante, os indivíduos que se autodenominaram de brancos, foram considerados como brancos, 86% dos pacientes (n=129) e os demais, de não brancos 14% (n=21) (www.ibge.gov.br). Não se observou associação entre evolução e etnia (Fisher; p=0,7402).

✓ TABAGISMO

Os pacientes que não fumavam eram 87 (69,05%) e os que fumavam 39 (30,95%). Não houve associação entre o fumo e evolução (Fisher; p=0,8571).

✓ ASSOCIAÇÃO QUANTO A FAIXA ETÁRIA

Dividindo-se os pacientes em indivíduos que apresentavam ao diagnóstico idade < 45 anos e os que apresentavam idade ≥ 45 anos, observamos que 51,33% (n=77) dos indivíduos que evoluíram livres de doença tinham < 45 anos de idade e os com idade ≥ a 45 anos eram 34% (n=51) (Fisher; p=0,918).

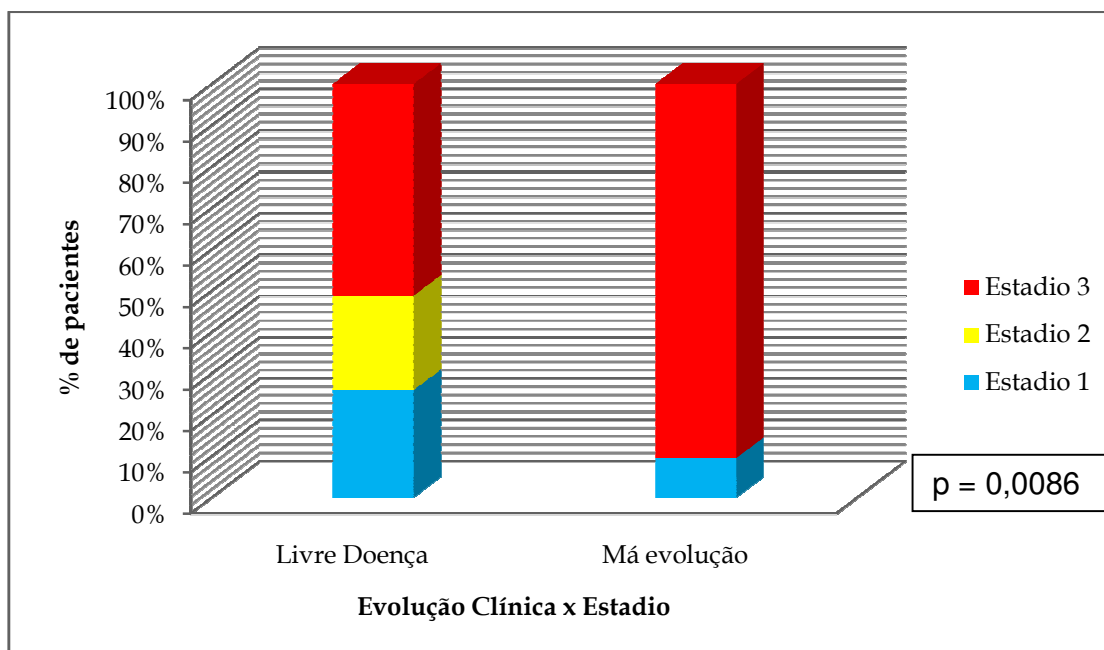
✓ **ASSOCIAÇÃO COM OUTROS CÂNCERES**

A presença de um segundo câncer foi constatada em 15 (10%) dos nossos pacientes: câncer de mama em 8 casos; câncer de bexiga em 2; câncer de ovário em 1; de cérebro em 1; de nervo periférico em 1; carcinóide de estômago em 1; linfoma em 1. Comparando os indivíduos que apresentavam história familiar de câncer, observamos associação entre historia familiar de câncer e evolução. Os pacientes livres de doença e que apresentavam historia familiar de câncer eram 41 (46,59% do total de pacientes) contra 38 (43,18% do total). Não houve associação entre a evolução do CP e câncer de mama ou outro segundo câncer.

✓ **ESTADIO CLÍNICO**

Pacientes com CP no estadio 1 representavam-se livres de doença em 22,15% (n=33) do total dos casos. No estadio 2 evoluíram livres de doença 19,46% (n=29) dos casos. No estadio 3 havia 43,62% (n=65) de indivíduos livres da doença. Ao compararmos com os com má evolução a maioria dos pacientes apresentavam-se no estadio 3 (19 pacientes, 12,75% do total), apenas 1 (0,67% do total) era o estadio 2 e 2 (1,34% do total) era do estadio 1. Assim, encontramos correlação entre estágio e evolução (X^2 ; p=0,0086) (gráfico 3).

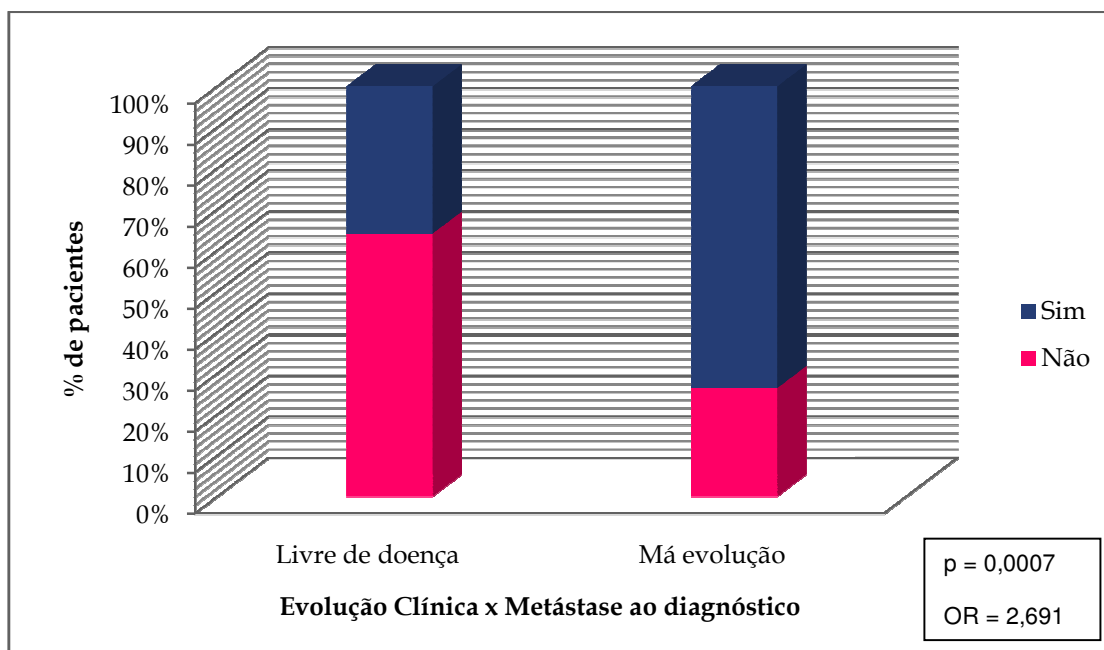
GRÁFICO 3. Relação entre os diferentes estadios para o câncer da tiróide e evolução clínica.



✓ METÁSTASES AO DIAGNÓSTICO

A presença de metástases linfonodais ou à distância ao diagnóstico foi nitidamente relacionada à evolução clínica dos pacientes. Os indivíduos com má evolução e metástases ao diagnóstico eram 16 (10,74% do total), e os sem metástases eram 5 (3,36% do total de casos) Entre os pacientes que estavam livres de doença 55,03% (n=82) do total de casos, não apresentavam metástases ao diagnóstico enquanto que 30,87% (n=46) apresentavam. (Fisher; $p=0,0007$). A presença de metástases ao diagnóstico aumentou o risco para má evolução 269 vezes (OR=2,691; 95% de IC: 1,238 a 5,847) (gráfico 4).

GRÁFICO 4. Relação entre a presença de metástases ao diagnóstico e evolução clínica



2. DADOS DO TUMOR

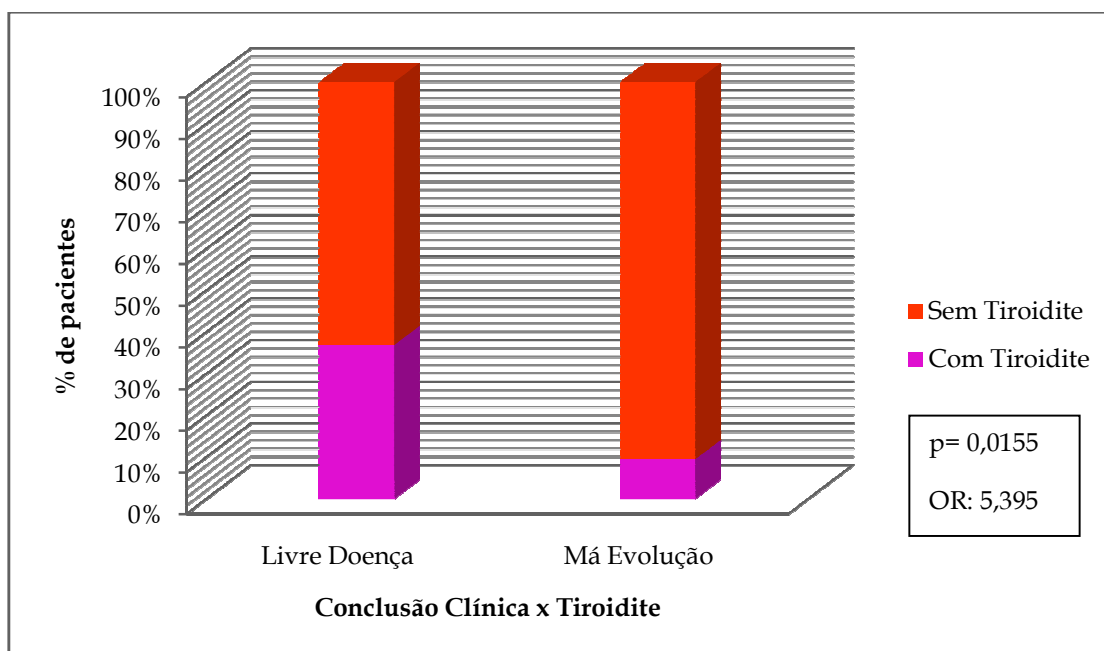
Ver resumo dos dados clínicos em Tabela 7 – Apêndice 5

✓ TIROIDITE

Entre os indivíduos com má evolução 12,84% do total (n=19) não apresentavam tiroidite e nesse grupo apenas 2 (n=1,35% do total) apresentava. Entre os pacientes que evoluíram livres da doença havia 31,08% do total (n=46) com diagnóstico anatomopatológico de tiroidite e 54,73% (n=81) sem tiroidite. Ao Essa análise demonstrou ser significativa (Fisher; $p= 0,0155$). A ausência de

tiroidite no AP aumenta o risco de má evolução, o odds ratio foi 5,395 (95% IC: 1,202-24,2) (gráfico5).

GRÁFICO 5. Relação entre a presença de tiroidite no exame anatomopatológico e a conclusão clínica.



A presença de tiroidite aumentou significativamente o tempo livre de doença (LogRank; p=0,008) (Figura 6).

Análise de regressão logística múltipla ajustada para sexo e faixa etária identifica a ausência de tiroidite como fator independente de risco para uma má evolução (regressão logística múltipla; p=0.0488).

✓ **DIAGNÓSTICO ANATOMO-PATOLÓGICO**

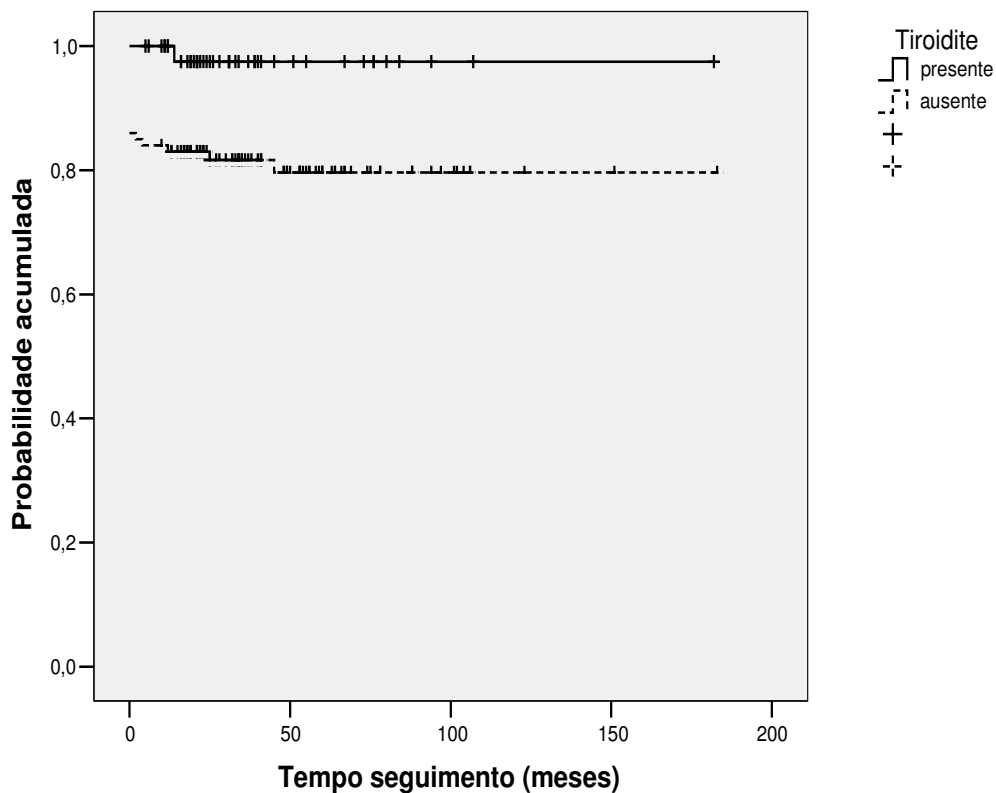
Variantes histológicas do CP:

Esta análise comparou o CPC com as demais variantes histológicas em conjunto. Os CPC totalizaram 94 casos (62,6% do total), os com CPCA eram 13 (8,6% do total), os com CPVF totalizaram 39 casos (26%) e 4 (2,6%) pacientes apresentavam outras variantes do CP (3 com a variante esclerosante difusa - CPVED e CPOn. Não foi possível realizar análises estatísticas com os 4 pacientes portadores de CPVED e CPOn, todavia os pacientes portadores de CPVED, todos: apresentaram má evolução, não tinham tiroidite no AP, apresentaram tumores maiores que 4 cm, estadio 3 e metástases na evolução.

Os pacientes portadores de CP estavam livres da doença em 52,67% (n=79) do total dos casos enquanto nas demais variantes do CP 32,67% (n=49) não apresentavam sinais da doença. Entre os indivíduos que apresentaram uma má evolução, 10% do total (n=15) CPC e 4,67% (n=7) eram portadores das demais variantes (Fisher; p valor = 0,5626).

Compararam-se conjuntamente os pacientes com CPC com os indivíduos com CPCA e CPVF separadamente e não houve diferenças estatísticas.

Figura 6. Curva de Kaplan – Meier para o Tempo Livre de Doença entre a Presença ou Ausência de Tiroidite.



✓ MULTIFOCALIDADE:

A multifocalidade estava presente em 44% (n=66) dos casos. A comparação entre os livres de doença e com má evolução não demonstrou significância estatística (X^2 ; p valor = 0,8817).

✓ CÁPSULA TUMORAL:

Não foi observada diferença estatística (Fisher; p valor = 0,7243).

✓ INVASÃO TUMORAL:

A presença de invasão tumoral demonstrou diferenças estatísticas quando comparada com a evolução clínica dos pacientes. A invasão tumoral estava presente em 12,9% (n=16) dos pacientes com má evolução; ausente em 36,29% (n=45) dos livres de doença e em 1,61% (n=2) dos com má evolução. (X^2 ; $p=0,0113$) (gráfico 6).

✓ TAMANHO DO TUMOR

O tamanho do tumor demonstrou ser um fator importante na evolução dos pacientes estudados. A análise foi realizada comparando-se tumores <2 cm, de 2 a 4 cm e >4 cm. Entre os indivíduos com má evolução 4% (n=6) apresentavam tumores <2 cm, 3,3% (n=5) com tumores de 2 a 4 cm e 6,76% (n=10) com tumores > 4cm. Entre os pacientes livres de doença 52,6% (n=79) apresentavam tumores < 2 cm ; 22% (n=33) tumores de 2 a 4 cm e 10% (n=15) tumores > 4 cm. (X^2 ; $p=0,0002$) (gráfico 7).

GRÁFICO 6. Relação entre a presença de invasão tumoral no anatomopatológico e a evolução

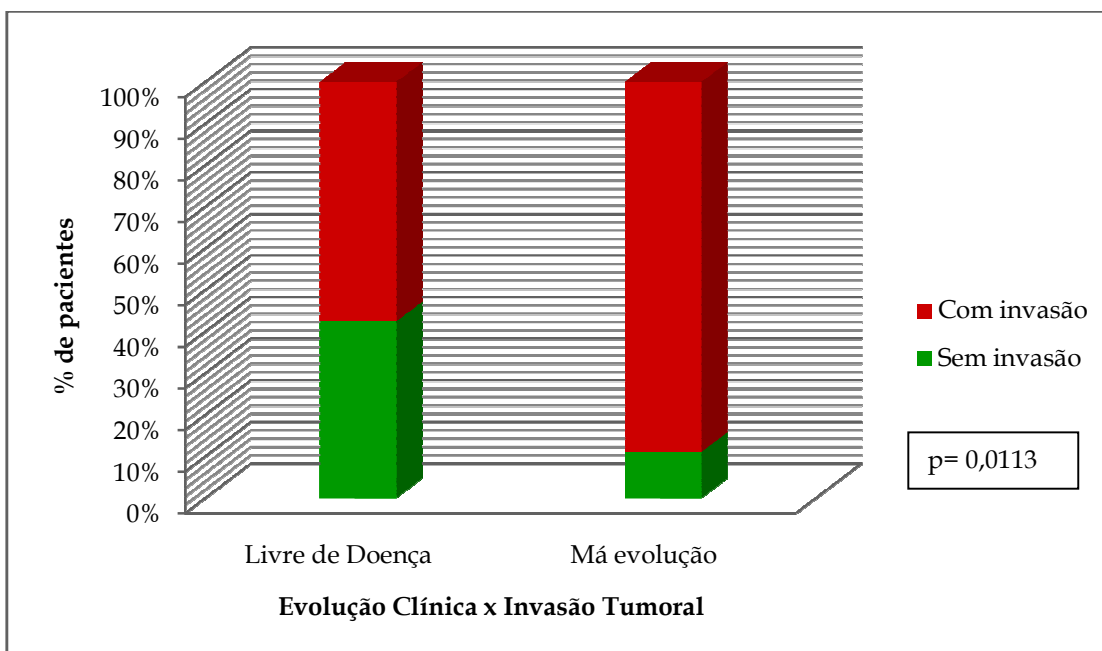
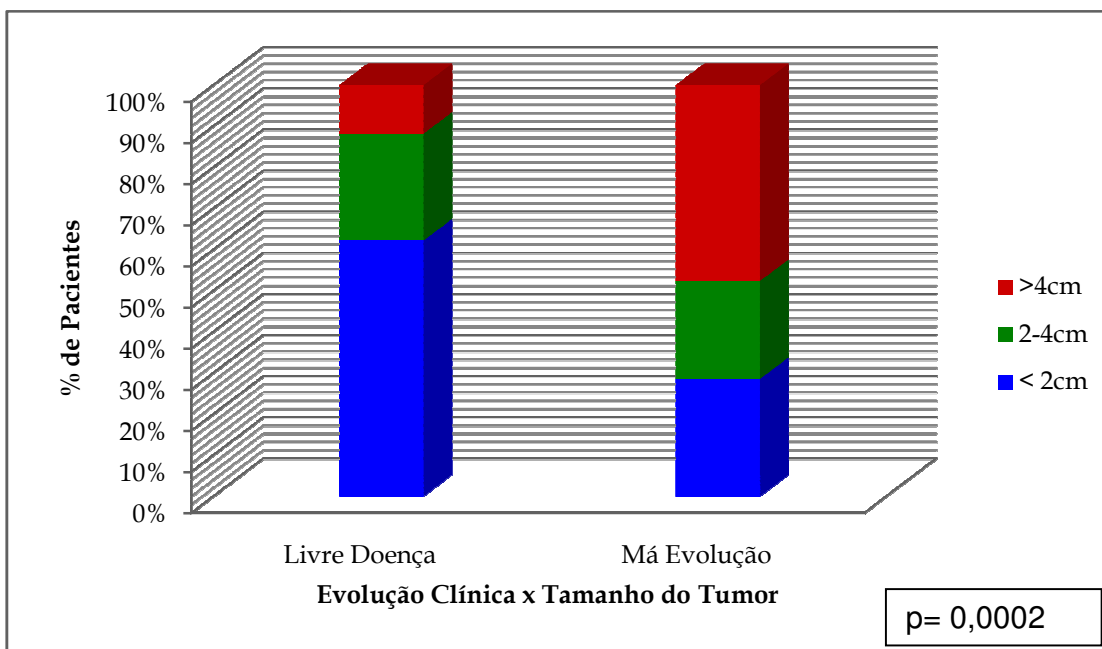


GRÁFICO 7. Relação entre os diferentes tamanhos de tumores e a evolução



5.C) AVALIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES COM A INVASÃO TUMORAL

A análise dos nossos casos revelou que 39,31% (n=57) não apresentavam invasão tumoral no anatomopatológico e 60,69% (n=88) apresentavam. Ver resumo na Tabela 8 – Apêndice 6.

1. DADOS CLÍNICOS

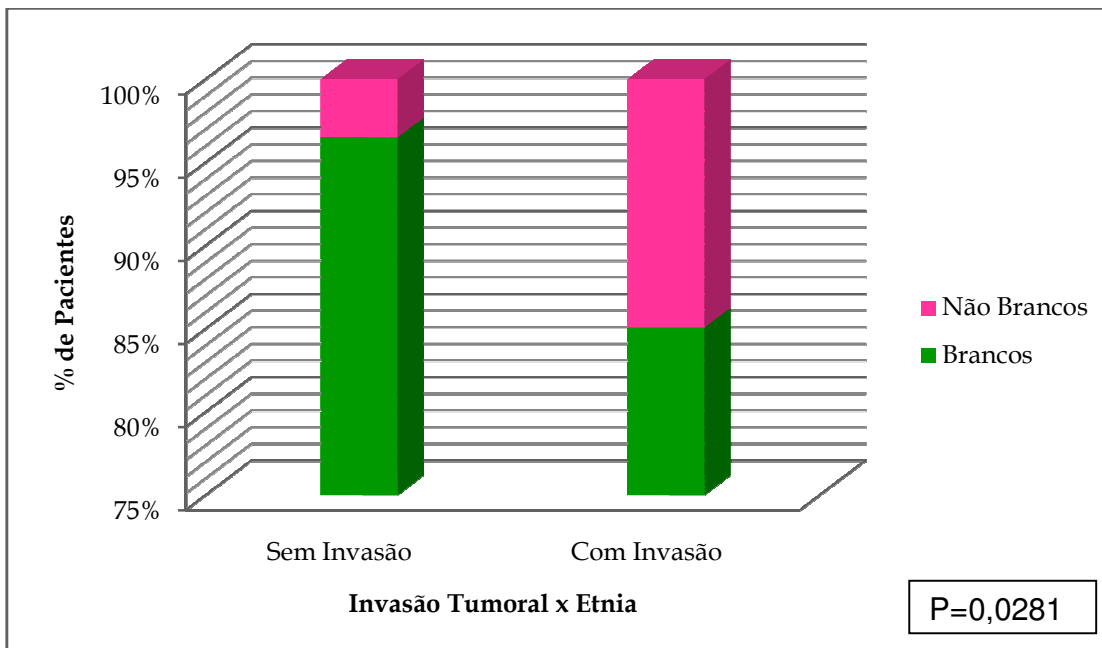
✓ SEXO

A avaliação realizada demonstrou que a invasão tumoral estava presente em 68 mulheres (46,9% do total de casos) e em 20 homens (13,8% dos casos), no entanto, não houve significância estatística (X^2 ; $p=0,0614$).

✓ ETNIA

Nos indivíduos classificados como brancos a presença de invasão ocorreu em 51,39% (n=74) do total de casos, enquanto que nos não brancos ocorreu em 9,03% (n=13). Entre os pacientes que não apresentavam invasão tumoral havia 38,19% (n=55) do total de brancos e 1,39% (n=2) de não brancos. Esta análise obteve diferença estatística (X^2 ; $p=0,0281$). (gráfico 8)

GRÁFICO 8. Relação entre a Etnia e a presença ou ausência de Invasão Tumoral.



✓ TABAGISMO

Observou-se que nos pacientes que apresentavam invasão tumoral 40,17% (n=47) do total não eram fumantes e 17,1% (n=20) eram fumantes. Os que não apresentavam invasão tumoral 28,21% do total de casos (n=33) não eram fumantes e 14,53% (n=17) eram fumantes (X^2 ; p=0,6330).

✓ IDADE AO DIAGNÓSTICO

A invasão tumoral estava presente em 47 (32,4% do total) pacientes com idade < 45 anos e em 41 (28,3%) dos com idade \geq 45 anos. Entre os pacientes com idade ao diagnóstico < 45 anos, 20,69% do total (n=30) não apresentavam invasão tumoral. Nos pacientes com idade ao diagnóstico \geq 45 anos, 18,62% (n=27) não apresentavam invasão (X^2 ; p=0,9270).

✓ ASSOCIAÇÃO COM OUTROS TIPOS DE CÂNCER

Avaliamos a relação entre a presença de invasão tumoral e a associação com outros tipos de câncer e não observamos diferenças estatísticas, com o segundo câncer de mama (Fisher; p valor = 0,7292), com outros cânceres não mama (X^2 ; p valor foi de 0,4366) e com historia familiar de câncer (X^2 ; p=0,3752).

A invasão tumoral estava presente em 4 (3,74% do total) das pacientes que apresentavam segundo câncer de mama, em 9 (8,33% do total) de pacientes com segundo câncer não mama e em 26 (24,76% do total) pacientes com história familiar de câncer.

✓ ESTADIO CLÍNICO

Havia mais pacientes em estadios mais avançados entre os pacientes com invasão tumoral do que nos demais (X^2 ; p=0,0001) (gráfico 9).

✓ METÁSTASES AO DIAGNÓSTICO

A análise realizada demonstrou que 44 (30,56% do total) pacientes com invasão tumoral apresentavam também metástases ao diagnóstico. A presença de invasão tumoral aumentou o risco de metástases ao diagnóstico o OR foi de 4,091 (Fisher; p=0,0004; OR 4,091 – 95% IC: 1,874-8,931) (gráfico 10).

GRÁFICO 9. Relação entre a presença de invasão tumoral no anatomo-patológico e estadio clínico.

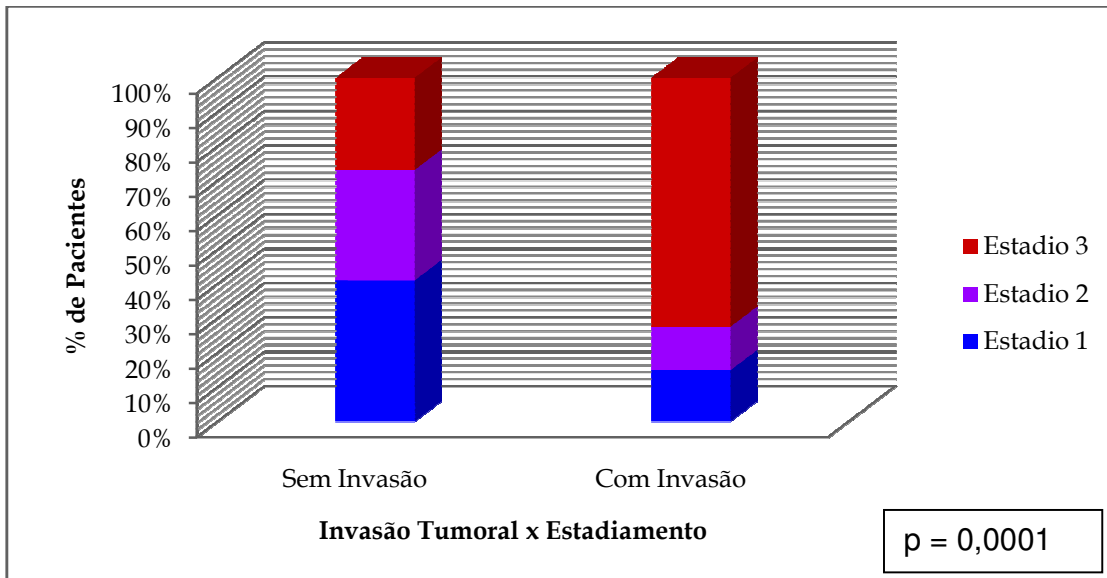
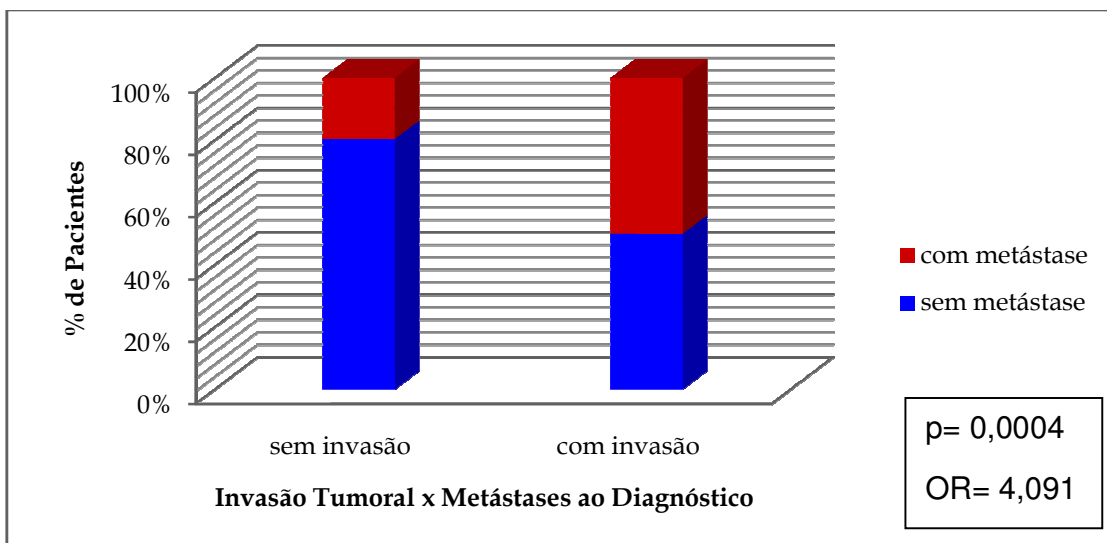


GRAFICO 10. Relação entre a invasão tumoral e a presença de metástases ao diagnóstico.



✓ METÁSTASES NO SEGUIMENTO

Nos pacientes com invasão tumoral, 19,85% do total de casos (n=26) apresentaram metástase no seguimento e 54 (41,2% do total) não apresentaram. Entre os pacientes sem invasão tumoral, 9 (6,87%) apresentaram metástases no seguimento e 42 (32% do total) não apresentava (X^2 ; p=0,0610).

✓ MORTE CAUSADA PELO TUMOR

A avaliação demonstrou que 1 (0,76% do total) dos pacientes que foi a óbito não apresentava invasão tumoral no AP e 5 (3,91%) apresentavam (Fisher; p=0,4029).

2. DADOS DO TUMOR

Ver resumo dos dados clínicos em Tabela 9 – Apêndice 7

✓ DIAGNÓSTICO ANATOMO-PATOLÓGICO

Variantes Histológicas do CP:

A invasão tumoral estava presente em 55 (38% do total) pacientes com CP Clássico e foram comparados com as demais variantes juntas, nestas a invasão tumoral ocorreu em 33 pacientes (22,7% do total). Em 24,14% (n=35) dos pacientes que não apresentavam invasão tumoral eram CP clássicos e 15,17% (n=22) pertencentes as demais variantes histológicas (X^2 ; p=0,8942).

Variante Células Altas:

Na análise dos indivíduos com invasão tumoral, 38% do total (n=55) eram portadores da forma clássica e 8 (5,33 do total) apresentavam a variante

histológica células altas, mas não houve significância estatística. A ausência de invasão tumoral ocorreu em 2 (1,33% do total) pacientes com CPCA (Fisher; $p=0,3174$).

Variante Folicular:

Os pacientes com invasão tumoral e CPVF eram 23 (15,3% do total) e os sem invasão tumoral eram 19 (12,6% do total) foram comparados com os portadores de CPC (55 indivíduos: 38% do total com invasão e 35:24,14% sem invasão) (X^2 ; $p=0,4895$).

✓ MULTIFOCALIDADE:

Entre os pacientes que apresentavam invasão tumoral 24,6% de pacientes desta análise ($n=37$) apresentavam múltiplos focos tumorais e 34% ($n= 51$) eram únicos. Em contrapartida, 11,3% ($n=17$) dos pacientes que tinham múltiplos focos e em 26,6%, que eram únicos, não apresentaram invasão tumoral (X^2 ; $p=0,1371$).

✓ CÁPSULA TUMORAL:

A informação sobre a cápsula tumoral estava presente em 91 tumores. Entre os pacientes que apresentavam invasão tumoral, 12% ($n=18$) possuíam tumores capsulados e 26% ($n=39$) eram não capsulados Os sem invasão tumoral representaram 8,6% ($n=13$) de tumores capsulados e 14% ($n=21$) de não capsulados (X^2 ; $p=0,5169$).

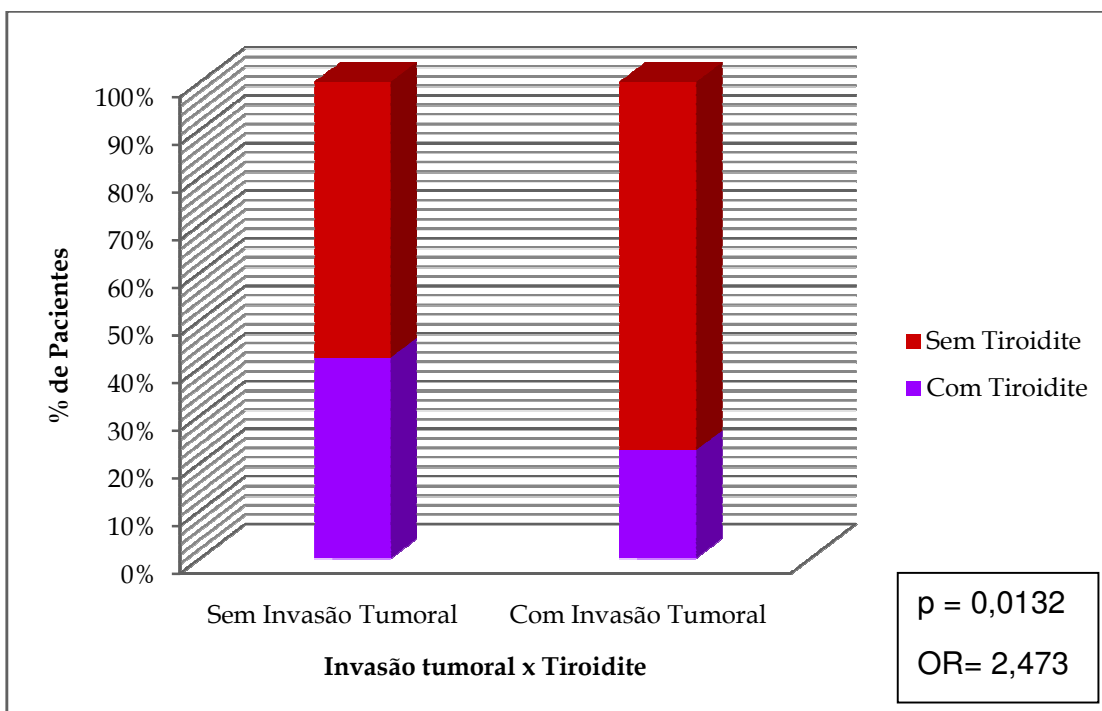
✓ TIROIDITE

A presença de tiroidite no AP demonstrou diferenças estatísticas. A ausência de tiroidite ocorreu em 68 (45,3% do total) dos que apresentaram invasão tumoral. Os pacientes com tiroidite eram 44 no total, destes, 20 (13,8% do total) apresentavam invasão tumoral e em 24 (16%) não apresentavam. A ausência de tiroidite aumentou o risco para o aparecimento de invasão tumoral, o OR foi 2,473 (X^2 ; $p=0,0132$; OR= 2,473 95% IC: 1,198-5,104) (gráfico11).

✓ TAMANHO DO TUMOR

O tamanho do tumor nesta avaliação não demonstrou diferenças estatísticas. Nos indivíduos com invasão tumoral 30% do total de casos ($n=45$) apresentavam tumores < 2 cm , 16% ($n=24$) tumores de 2 a 4 cm e 11,3% ($n=17$) tumores > 4 cm. Nos pacientes sem invasão tumoral 24,6% ($n=37$) apresentavam tumores menores que 2 cm ; 10% ($n=15$) tumores de 2 a 4 cm e 2,6% ($n=4$) tumores maiores que 4 cm . (X^2 ; $p=0,0916$).

GRÁFICO 11. Relação entre a presença de invasão tumoral e de tiroidite no anatomo-patológico.



5.D) AVALIAÇÃO DAS CORRELAÇÕES COM A MORTE CAUSADA PELO TUMOR

Sete pacientes (4,55% da casuística) evoluíram a óbito devido ao tumor tiroídiano.

1. DADOS CLÍNICOS

A comparação realizada com os pacientes que evoluíram a óbito apresentou diferenças estatísticas apenas em um aspecto: a presença de metástases ao diagnóstico estava presente em seis dos sete pacientes. As análises realizadas com o sexo (5 eram do sexo feminino e 2 do sexo masculino - Fisher; p valor = 0,6115), cor (6 pacientes eram brancos e apenas 1 era não branco - Fisher; p valor = 0,6115), tabagismo (3 pacientes não eram fumantes e 1 era - Fisher; p valor = 1,0), idade <45 e ≥ 45 (5 pacientes apresentavam idade ≥ 45

anos e 2 < 45 anos - Fisher; p valor = 0,1390), não demonstraram significância estatística. Nenhum paciente apresentou um segundo câncer. Os sete pacientes estudados que evoluíram a óbito apresentavam-se no estadio 3 e todos apresentaram metástases no seguimento (Fisher; p=0,0180) (Gráfico 12).

2. DADOS DO TUMOR

Esta análise revelou que os pacientes que faleceram, todos os sete, apresentavam tumores > que 2 cm, 4 indivíduos com tumores de 2 a 4 cm e 3 com tumores > 4 cm, a comparação realizada com os pacientes vivos demonstrou significância estatística (Fisher; p=0,0037) (gráfico 13).

Quatro dos pacientes que faleceram eram portadores de CPC e 3 (1,95%) de outras variantes histológicas do CP (2 com CPCA; 1 com CPCV) (Fisher; p=0,7102).

Dos indivíduos que faleceram, um apresentava cápsula tumoral e três eram não capsulados, 2 pacientes apresentavam tiroidite no anatomo-patológico.

GRÁFICO 12. Relação entre a morte causada pelo tumor e a presença de metástases ao diagnóstico

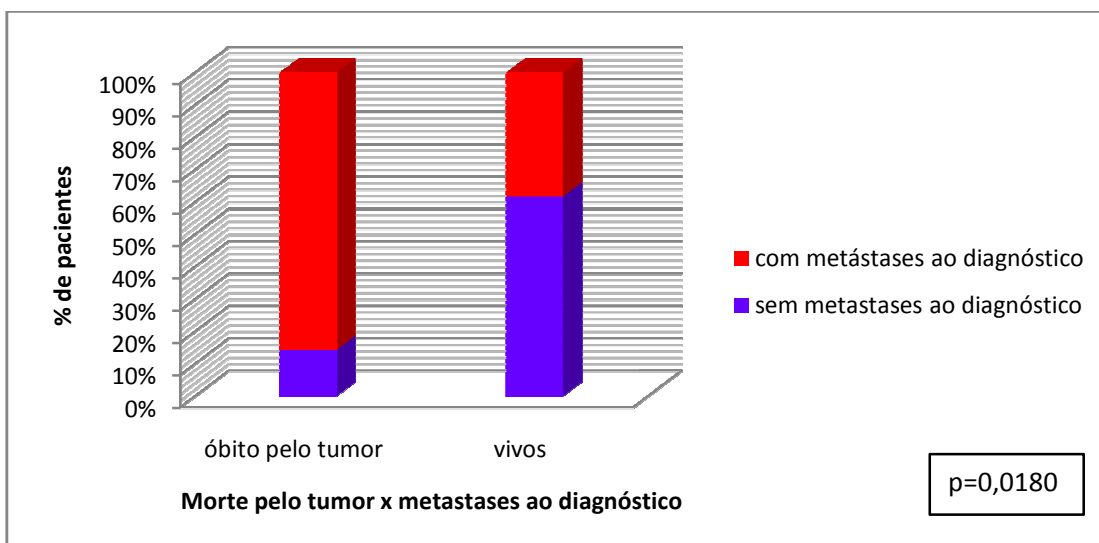
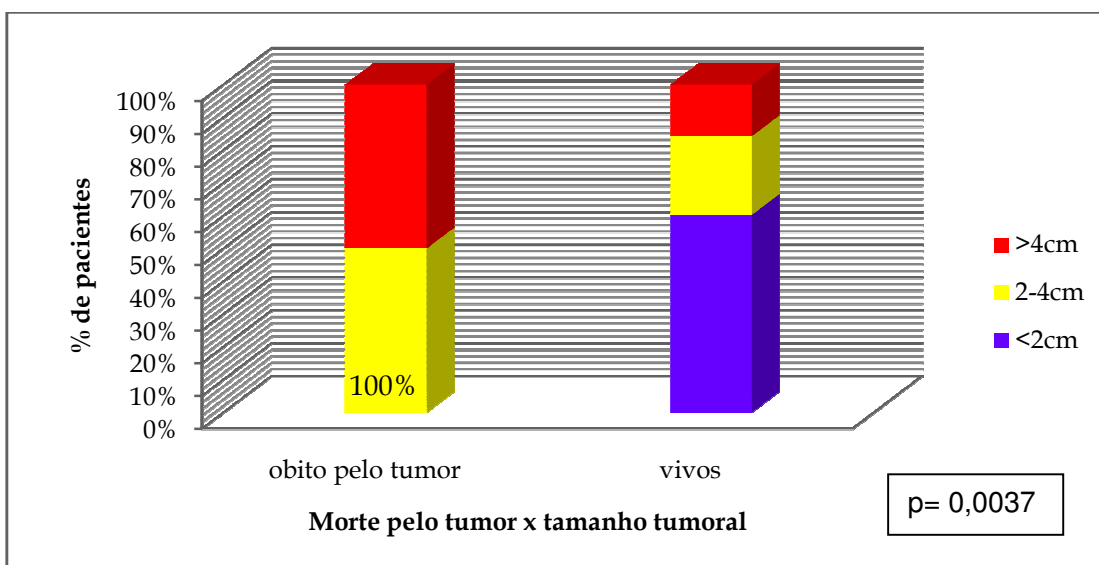


GRÁFICO 13. Relação entre a morte causada pelo tumor e os diferentes tamanhos de tumores.



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A oncoproteína *MUC1* tem sido encontrada na maioria dos carcinoma humanos, nos nossos pacientes a expressão do RNAm e da proteína *MUC1* não obteve o resultado esperado. Através da imunoistoquímica obtivemos elevada expressão de *MUC1* nos carcinomas papilíferos estudados, 82,19% apresentaram expressão contra 17,81% negativos. Nas diversas comparações realizadas com dados clínicos e do anatomo-patológico não conseguimos demonstrar a relação entre expressão da proteína *MUC1* e mau prognóstico ou aspectos de agressividade tumoral. BAEK *et al*, 2007 conseguiu correlacionar a expressão maior de *MUC1* com alguns aspectos de agressividade como o tamanho do tumor, extensão extra-tiroidiana e a classificação III e IV do TNM, o que não ocorreu no nosso estudo. WREESMANN *et al*, 2004 encontrou super expressão de *MUC1* apenas nos CP com comportamento mais agressivo (células altas) em contraste com pouca expressão nos CP clássicos e ausência de expressão na tiróide normal. PATTEL *et al*, 2005 também observou a expressão de *MUC1* apenas nas variantes mais agressivas do CP. Não conseguimos reproduzir esses resultados. ABRASIMOV A., *et al*, 2007 também avaliou a expressão de *MUC1* em diferentes variantes histológicas do carcinoma papilífero: células colunares, oncocítica, clássico, microcarcinomas e encontrou super expressão em todas as variantes estudadas, mas diminuição nas variantes foliculares. Estes autores tampouco conseguiram provar que *MUC1* se relacionava a agressividade.

A análise por Real Time – PCR apresentou resultados semelhantes. Apenas a comparação realizada entre a presença de metástases ao diagnóstico e expressão de *MUC1* apresentou diferença estatística ($p=0,0216$), no entanto, de modo inesperado. Consideramos a expressão < 3 como menos expresso e > 3 mais expresso. Nos indivíduos que apresentaram metástases ao diagnóstico, apenas em 8% a expressão foi maior que 3, contrastando com os 42,6% que não apresentavam metástases, mas uma maior expressão de *MUC1*. Esperávamos que ocorresse exatamente o oposto, uma maior expressão nos que obtivessem algum aspecto que levasse a uma pior evolução e não o contrário. BAEK *et al*, 2007 encontrou expressão de RNAm de *MUC1* em tecidos normais e proteína mais expressa no CP do que tecido normal e adenoma folicular, correlacionada alguns aspectos de pior prognóstico para o CP, mas sem correlação com recorrência tumoral. Na literatura pesquisada, nenhum estudo conseguiu reproduzir os resultados obtidos por WREESMANN V., *et al*, 2004, todavia, a análise das mucinas, em especial *MUC1* tem sido relacionada com diversos tipos de câncer (pâncreas, mama) e geralmente o aumento da expressão se dá naqueles com prognóstico mais reservado, devido ao fato de *MUC1* se correlacionar com moléculas de adesão e reduzir a expressão de E caderina confere às células tumorais uma capacidade maior de se desprenderem do seu sítio para colonizarem outras áreas do corpo. (PATEL K., *et al*, 2005). BAEK *et al*, 2007, de modo semelhante ao nosso estudo, comparou aspectos clínicos como sexo, idade, metástases linfonodais, recorrências, multifocalidade, tamanho, invasão com imunohistoquímica e RT-PCR de *MUC1* e não obteve significância estatística. É possível então, afirmar que a análise do gene da mucina 1 não foi,

até o momento, útil para avaliação de prognóstico ou como um marcador tumoral de agressividade. Vários estudos como os de WREESMANN V., *et al*, 2004; PATEL K, *et al*, 2005; BAEK *et al*, 2007; MAGRO G., *et al*, 2003 SIRAGUSA M., *et al*, 2007 BARUCH A., *et al*, 1999 sugerem o papel de *MUC1* na patogênese do CDT, mas muito pouco ainda se sabe sobre sua real relação com o câncer da tireóide. É possível que em cada tecido essa oncoproteína aja de modo diferente.

Neste estudo avaliamos o resultado do tratamento de 150 pacientes com CP da tireóide. Devido à sobrevida longa, acima de 10 anos em mais de 90% dos pacientes, e à mortalidade relativamente baixa destes pacientes, a interpretação dos fatores envolvidos em sua evolução torna-se muito difícil como encontrado por SANDERS *et al*, 1998, PELEGRITTI *et al*, 2004). Entretanto, confirmando a literatura, observamos que os pacientes do sexo masculino apresentavam uma pior evolução clínica (PALME C., *et al*, 2004, PELLEGRITTI G., *et al*, 2004; SIPPOS J. & MAZZAFERRI E., 2008, MORGANTI S., *et al*, 2005; SCHLUMBERGER M. & PACINI F., 2006; MAZZAFERRI E. & KLOOS R., 2001; REYNOLDS M. *et al*, 2005; GULCELIK N., *et al*, 2008). Os homens representaram 18,6% (n=28) e entre estes, 28,57% (n=8) apresentava evolução clínica considerada desfavorável em contraste com as mulheres que apresentaram evolução ruim em apenas 11%. Segundo PALME *et al*, 2004, mulheres jovens têm o melhor prognóstico e homens acima de 45 anos, o pior. Nesse mesmo estudo, o sexo masculino foi considerado fator de risco independente de mau prognóstico. No estudo realizado por Davidson H., *et al*, 2008, 183 pacientes acompanhados por 35 anos foram selecionados por apresentarem recorrências locais e a

distância, e a incidência foi de 40% para o sexo masculino, mesmo quando os pacientes foram submetidos ao esvaziamento cervical na terapia inicial.

A faixa etária é reconhecida como um dos principais fatores de prognóstico para o CDT (SHRIME M., *et al*, 2007, BOI, F., *et al*, 2006, HORN-ROSS P., *et al*, 2001, SCHLUMBERGER M., *et al*, 2007, HOVENS G., *et al*, 2007, JONKLAAS J., *et al*, 2006). A idade do paciente é importante ao ponto de ser considerada como um indicador para se realizar tratamentos iniciais mais agressivos (PALME C., *et al*, 2004, GHORI F., *et al*, 2002). No entanto, em nossa casuística, a idade ao diagnóstico não apresentou correlação com nenhum fator clínico ou tumoral de má evolução, apesar de idade ser considerada em praticamente todos os escores para se prever a evolução dos pacientes com CDT, como o AMES, AGES, MACIS, (HO *et al*, 2007) nem todos os estudos corroboram essa hipótese como os de PALME *et al*, 2004; HAY *et al*, 2008; HAYMART *et al*, 2008; TONIATO *et al*, 2008.

O estudo de HAY 2008, acompanhou 900 pacientes por 60 anos e não houve correlação nem com o sexo nem com a idade. A idade foi mais importante quando há a presença de metástases e recorrências como mostra o estudo de MIHAILOVIC *et al*, 2007, nessa série, a idade do aparecimento das metástases e recorrências claramente influenciou o prognóstico. A probabilidade de sobreviver foi reduzida pela metade (de 85% para 44%), em 5 anos, se a idade do aparecimento da metástase fosse superior ou igual a 45 anos. Um estudo semelhante obteve resultados similares por um período de acompanhamento maior, de 20 anos (DURANTE *et al*, 2006). ZAYDFUNDIN, *et al*, 2008, também

observou que a idade tinha influência quando associada às metástases linfonodais; em indivíduos acima de 45 anos a presença de linfonodos comprometidos aumentou o risco de morte pelo tumor em 46% nos carcinomas papilíferos e foi considerada fator independente da idade nos carcinomas foliculares. A idade parece exercer mais influência no tratamento como demonstra o estudo de SCHLUMBERGER *et al*, 1996, apenas 46% dos pacientes com idade acima de 45 anos, captavam I_{131} , enquanto 90% dos pacientes com idade inferior a 45 anos, captavam o radiodo. É possível que o tempo de seguimento curto para se avaliar o carcinoma papilífero tenha sido o principal fator de não obtermos diferenças significantes com relação à idade.

A etnia se correlacionou com a presença de invasão tumoral em nossa amostra. MORRIS *et al*, 2008, mostrou que a proporção de indivíduos afro – americanos que são diagnosticados com CDT é menor do que a de caucasianos e relacionou este fato ao acesso ao sistema de saúde. GHORI *et al*, 2002 também encontrou que indivíduos negros tem menos CDT, mas não relacionou o fato com aspectos sócio-econômicos. Não possuímos dados socioeconômicos para definir a real importância deste dado em nossa população. Além disso, o número menor de indivíduos não brancos pode ter contribuído para as diferenças encontradas.

O tabagismo não se correlacionou com a evolução dos pacientes com CP. Nosso grupo e outro (BUFALO *et al*, 2006; MACK *et al*, 2003) mostraram uma relação inversa entre tabagismo e incidência de CDT, mas nenhum estudo até o momento correlacionou tabagismo com a evolução dos pacientes.

Ainda entre os fatores de história analisados, ressaltamos a maior incidência de pacientes com história familiar de câncer, 47,73% apresentava história para diversos tipos de câncer na família (4-tiróide, 13-mama, 17-gastrointestinal, 2-ovário, 5-fígado, 5-pulmão, 5-próstata, 7-melanoma, 8-boca e orofaringe, 2-ósseo, 2-SNC, 2-bexiga, e 1 de: vesícula, laringe, pâncreas, LLC, adrenal, útero, rim, carcinóide). Alguns tumores, como por exemplo, o de mama pode partilhar vias comuns aos tumores tiroidianos, como é o caso do gene BRAF, participante ativo do desenvolvimento do carcinoma papilífero da tiróide (GARCIA-ROSTAN *et al*, 2007). A elevada presença de história familiar pode nos levar a pensar que existam fatores genéticos comuns a grande maioria desses tumores apresentados, mas esse não foi objeto de nosso estudo e não podemos comprovar este fato no momento.

A presença de um segundo câncer foi constatada em 15 pacientes (10%). Na nossa avaliação 8 pacientes apresentaram câncer de mama, em 1 o diagnóstico foi simultâneo e nas demais, ocorreu após o diagnóstico de CP, os tumores de ovário, cérebro, nervo periférico, carcinóide de estômago também estavam presentes nos pacientes avaliados e segundo SANDEEP *et al*, 2006; RUBINO *et al*, 2003 é possível que esses tumores dividam mecanismos patológicos genéticos que levem ao aparecimento da malignidade. 2 pacientes apresentaram câncer de bexiga e linfoma não Hodking e essas neoplasias parecem ter relação com o tratamento com o I₁₃₁ SANDEEP *et al*, 2006 realizou um estudo multicêntrico com 39.000 indivíduos portadores de câncer de tiróide num período de 25 anos para avaliar a presença de segundo câncer primário e

constatou um aumento de 30% no risco de desenvolver um segundo câncer primário em comparação com a população geral. SANDEEP *et al*, 2006, encontrou: (1) Associações bidirecionais entre o câncer de tiróide e outros tipos de câncer ocorreram com: câncer de faringe e cavidade oral, glândulas salivares, estômago, colo retal, pele, mama, rim, cérebro, adrenal, sarcoma de tecido moles, linfoma não Hodking, leucemia. (2) Associações unidirecionais (indicam mais um efeito do tratamento) surgiram para o câncer de próstata após tratamento de câncer de tiróide. (3) O câncer de tiróide surgiu após o tratamento de cânceres tipo: esôfago, fígado, pâncreas, laringe, pulmão, pele (melanoma), colo e corpo uterinos, ovário, testículo, doença de Hodking. Na análise que realizamos não encontramos correlação entre a presença do segundo câncer e a agressividade do CP ou a sua evolução. Uma observação mais prolongada poderá mostrar novos casos de segundo câncer primário em nossos pacientes.

Em relação aos fatores que denominamos de tumorais, ou próprios da lesão cancerosa, o tamanho se associou à evolução clínica desfavorável e à morte, nos nossos pacientes, confirmando a literatura. PELEGRITTI *et al*, 2004, estratificando o tamanho dos tumores menores que 1,5 cm em 3 categorias (0,5; 0,6 a 1,0 e de 1,1 a 1,5), encontrou que a cada aumento no diâmetro, havia um aumento de outros fatores de pior prognóstico como multifocalidade, invasão tumoral extra-tiroidiana, acometimento de linfonodos. O tamanho do tumor claramente tem correlação com o prognóstico, sobrevida livre de doença e recorrência (KUO *et al*, 2008).

Observamos que as metástases detectadas ao diagnóstico tiveram importante repercussão na evolução dos pacientes estudados. Diversos estudos confirmam que a presença de metástases (linfonodais ou à distância) encurta a sobrevida dos pacientes com CDT (SANDERS & CADY 1998; PELLEGRITTI *et al*, 2004; DAVIDSON *et al*, 2008; VERBURG *et al*, 2007). Segundo PELLEGRITTI *et al*, 2004, a presença de linfonodos metastáticos detectados no tratamento cirúrgico inicial do CDT é um forte prognosticador de recorrências locais, à distância e a um menor tempo livre de doença, com OR de 4,49. Nos nossos pacientes a elevada incidência de metástases ao diagnóstico foi um fato. Pela avaliação realizada, 41,61% dos pacientes já apresentava metástases ao diagnóstico (linfonodais) e 56,37% apresentava-se no estadio 3, de fato essas características se associam com elevada probabilidade desses indivíduos apresentarem recorrências futuras, apesar do tratamento inicial adequado realizado com tireoidectomia total associada ao esvaziamento cervical em 148 pacientes, apenas em 2 pacientes a ressecção foi incompleta por motivos inerentes ao próprio tumor. A dose média de I_{131} foi de 202,82 mCi (\pm 165,38), todavia, em 39 pacientes não conseguimos obter dados sobre a radioterapia, ainda sim os nossos pacientes permanecem sem sinais clínicos e laboratoriais do CP em aproximadamente 85% dos casos.

Segundo PALME *et al*, 2004 num estudo realizado com 574 pacientes por aproximadamente 10 anos, os principais fatores para o desenvolvimento de recorrências múltiplas de CDT ao longo dos anos foram o sexo masculino, idade avançada, tumor primário em estadio avançado (T3 e T4), o tamanho do tumor,

extensão extra-tiroidiana, tireoidectomia total com dissecação de linfonodos e terapia com I_{131} . No estudo de HAYMART *et al*, 2008, pode ser observada uma correlação entre os níveis de TSH nos pacientes com CDT e a presença de extensão extra-tiroidiana independente da idade, tamanho do tumor. A extensão extra-tiroidiana, definida como extensão do tumor além da cápsula e invasão nos tecidos/órgãos adjacentes, ocorre de 5 a 34% e é considerado um fator adverso de prognóstico muito bem estabelecido, sendo usada em diversos estadios clínicos como TNM, EORTC, AGES, AMES, MACIS. (HO *et al*, 2007).

Observamos correlação entre a presença de metástases ao diagnóstico do CP, invasão tumoral e a presença de tiroidite nos nossos pacientes. A presença de tiroidite conferiu um fator de proteção contra o CP, confirmando achados anteriores de nosso grupo que também mostraram melhor evolução de pacientes com evidências de auto-imunidade (SOUZA *et al*, 2004). LOH *et al*, 1999, também observou que indivíduos com tiroidite no AP, apresentaram melhor prognóstico, e considerou que a resposta inflamatória do organismo contra o tumor poderia controlar o crescimento e proliferação das células tumorais. Esse mesmo autor observou que a tiroidite estava mais presente nos CP clássico do que nas demais variantes histológicas. Na nossa avaliação os pacientes que apresentavam tiroidite, 59,61% eram portadores de CPC, 32,69% de CPVF e 7,69% com CP células altas. Dos 13 pacientes com a variante células altas, 4 apresentavam tiroidite no AP, talvez este fato tenha concedido aspectos mais protetores a essa forma histológica tão reconhecida por ter um comportamento mais agressivo e é possível que fatores como este, a presença de tiroidite no tecido não neoplásico,

seja um dos motivos para o CP ser tão heterogêneo na sua apresentação clínica e evolução.

Não verificamos relação entre as variantes consideradas mais agressivas do CP (CPCA,CPVF) e a evolução, ou invasão ou morte pelo tumor. Talvez o número pequeno de pacientes com as demais variantes do CP tenha reduzido o poder de cálculo da análise estatística (ITO *et al*, 2008, GHOSSEIN & LIVOLSI, 2008). Embora 1,95% dos casos que evoluíram a óbito fossem de pacientes com variantes histológicas mais agressivas, o pequeno número de mortes pelo CP impediu maiores análises deste grupo.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- Não foi possível correlacionar a expressão do gene *MUC1* com prognóstico de pacientes portadores de CP da Tiróide
- Não conseguimos correlacionar os achados da expressão do gene *MUC1* com aspectos clínicos ou anatomo-patológico ou de evolução dos pacientes com carcinoma papilífero da tiróide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROSIMOV A., SAENKO V., MEIRMANOV S., NAKASHIMA M., ROGOUNOVITCH T., SHKURKO O., LUSHNIKOV E., MITSUTAKE N., NAMBA H., YAMASHITA S. The cytoplasmic expression of *MUC1* in papillary thyroid carcinoma of different histological variants and its correlation with cyclin D1 overexpression. *Endocr Pathol*, 2007;18(2):68-75.

AIN KB.: Thyroid Cancer I. Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 24(4):711-747, 1995.

BAEK S.K., WOO J.W., KWON S.Y., LEE S.H., CHAE Y.C., JUNG K.Y. Prognostic significance of the *MUC1* and *MUC 4* expressions in thyroid papillary carcinoma. *Laryngoscope*, 2007;117:911-16.

BARUCH A., HARTMANN M., YOELI M., ADERETH Y., GREENSTEIN S., STADLER Y., SKORNIK Y, ZARETSKY J., SMORODISKY N., KEYDAR I., WRESCHNER D. The breast cancer-associated *MUC1* gene generates both a receptor and its cognate binding proteins. *Cancer Research*, 1999;59:1552-1561.

BOI, F., BAGHINO G., ATZENI F., LAI M.L., FAA G., MARIOTTI S. The diagnostic value for differentiated thyroid carcinoma metastasis of thyroglobulin (Tg) measurement in washout fluid from fine – needle aspiration biopsy of neck lymph nodes is maintained in the presence of circulating anti – Tg antibodies. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006;91(4):1364-1369.

BORRELLO M.G., DEGL'INNOCENTI D., PIEROTTI M.A. Minireview: Inflammation and cancer: the oncogene – driven connection. *Cancer Letters*, 2008;267:262-270.

BROSSART P., SCHNIDER A., DILL P., SCHMMANN T., GRÜNEBACH F., WIRTHS S., KANZ L., BÜHRING H-J., BRUGGER W. The epithelial tumor antigen *MUC1* is expressed in hematological malignancies and is recognized by *MUC1*-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Research*, 2001;61:6846-6850.

BUFALO N.E., LEITE J.L., GUILHEN A.C., MORARI E.C., GRANJA F., ASSUMPÇÃO L.V., WARD L.S. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer*, 2006;13(4):1185-93.

BURGESS J.R. Temporal trends for thyroid carcinoma in Australia: an increasing incidence of papillary thyroid carcinoma (1982-1997). *Thyroid*, 2002;12(2):141-149.

CHAN P.C., SILLS R.C., KISSLING G.E., NYSKA A. Induction of thyroid and liver tumors by chronic exposure to 2-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Arch Toxicol.* 2008;82:399–412.

CIAMPI R., NIKIFOROV Y.E. Minireview: RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*, 2007;148(3):936-941.

DACKIW A.P.B. & ZEIGER M. Extent of surgery for differentiated thyroid cancer. *Surgery of Clinical of North America*, 2004;84:817-832.

DAHIYA R., KWAK KS., BYRD J., HO S., YOON W.H., KIM Y. Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the *MUC1* mucin gene. *Cancer Research*, 1993;53:1437-1443.

DAVIDSON H.C., PARK B.J., JOHNSON J.T. Papillary thyroid cancer: controversies in the management of neck metastasis. *Laryngoscope*, 2008;118:21661-65.

DAVIES L. & WELCH H. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *Journal of the American Medical Association*, 2006; 295(18):2164-67.

DURANTE C., BAUDIN H., LEBoulLEUX S., TRAVAGLI H., CAILLOU B., LUMBROSO R., VATHAIRE F., SCHLUMBERGER M. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2006;91:2892-2899.

DWYER R., BERGERT E., O'CONNOR M., GENDLER S., MORRIS J. *In vivo* radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after *MUC1*-driven expression of the sodium iodide symporter (NIS). *Clinical Cancer Research*, 2005;11:1483-1489.

FAGIN J.A. Minireview: branded from star – distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid. *Molecular Endocrinology*, 2002;16:903-911.

FAGIN J.A. Perspective: Lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer – insights into pathogenesis and tumor – specific therapeutic targets. *Endocrinology*, 2002;143(6):2025-2028.

GAEMERS I., VOS H., VOLDERS H., VALK S., HILKENS J. A STAT-responsive element in the promoter of the Episialin/*MUC1* gene is involved in its overexpression in carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001;276(9):6191-6199.

GARCIA-ROSTAN G., ZHAO H., CAMP R.L., POLLAN M., HERRERO A., PARDO J., WU R., CARCANGIU M.L., COSTA J., AND TALLINI G. RAS Mutations Are Associated With Aggressive Tumor Phenotypes and Poor Prognosis in Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2003;21:3226-3235.

GHORI F.Y., GUTTERMAN-LITOFISKY D.R., JAMAL A., YEUNG S.C.J., AREM R., SHERMAN S.I. Socioeconomic factors and the presentation, management, and outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma, 2002;11:1009-1016.

GHOSSEIN R. & LIVOLSI V. Papillary thyroid carcinoma tall cell variant. *Thyroid*, 2008;11:1179-81.

GULCELIK N.E., GULCELIK M.A., KURU B. Risk of Malignancy in Patients With Follicular Neoplasm. Predictive Value of Clinical and Ultrasonographic Features *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(12):1312-1315.

HAY I.D., HUTCHINSON M.E., GONZALEZ-LOSADA T., McIVER B., REINALDA M., GRANT C.S., THOMPSON G.B., SEBO T., GOELLNER J.R. Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 900 cases observed in a 60-year period. *Surgery*, 2008;144:980-8.

HAYMART M.R., GLINBERG S.L., LIU J., SIPPEL R.S., JAUME J.C., CHEN H. High serum TSH in thyroid cancer patients occurs independent of age and correlates with extrathyroidal extension. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008 (ahead of print)

HEDINGER CHR, SOBIN LH (1988) Histological Typing of Thyroid Tumors. 2nd rev' ed. Germany, World Health Organization (International Histological Classification of Tumors, No.11).

HENDERIKX P., NEER N., JACOBS A., LINDEN E., ARENDS J.W., MÜLLBERG J., HOOGENBOOM H.R. A human immunoglobulin G1 antibody originating from an *in vitro*-selected Fab Phage antibody binds avidly to tumor-associated *MUC1* and is efficiently internalized. American Journal of Pathology, 2002;160(5):1597-1608.

HEY N., GRAHAM R.A., SEIF M.W., APLIN J.D. The polymorphic epithelial mucin *MUC1* in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1994;78:337-342.

HORN-ROSS P., LEE M., MORRIS J., WEST D., WHITTEMORE A., McDOUGALL I., NOWELS K., STEWART S., SPATE V., SHIAU A., KRONE M. Iodine and thyroid cancer risk among women in a multiethnic population: the bay area thyroid cancer study. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2001;10:979-985.

HOVENS G.C., STOKKEL M.P., KIEVIT J., CORSSMIT E.P., PEREIRA A.M., ROMIJN J.A., AND SMIT J.W.A. Associations of Serum Thyrotropin Concentrations with Recurrence and Death in Differentiated Thyroid Cancer. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007;92(7):2610–2615.

HU A., CLARK J., PAYNE R.J., ESKI S., WALFISH P.G., FREEMAN J.L. Extrathyroidal extension in well-differentiated Thyroid Cancer – macroscopic vs microscopic a a predictor of outcome. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2007;133(7):644-649.

ITO Y., HIROKAWA M., URUNO T., KIHARA M., HIGHIYAMA T., TAKAMURA Y., MIYA A., KOBAYASHI K., MATSUZUKA F., MIYAUCHI A. Prevalence and biological behavior of variants of papillary thyroid carcinomas: experience at a single institute. Pathology, 2008;40:617-622.

JONKLAAS J., SARLIS N.J., LITOFISKY D., AIN K.B., BIGOS S.T., BRIERLEY J.D., COOPER D.S., HAUGEN B.R., LADENSON P.W., MAGNER J., ROBBINS J., ROSS D.S., SKARULIS M., MAXON H.R., SHERMAN S.I. Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. Thyroid, 2006;16:1229–1242.

KAM J.L., REGIMBALD L.H., HILGERS J.H.M., HOFFMAN P., KRANTZ M.J., LOGENNECKER M., HUGH J.C. *MUC1* synthetic paptide inhibition of intracellular adhesion molecule-1 and *MUC1* binding requires six tandem repeats. Cancer Research, 1998;58:5577-5581.

KASHIMA K., YOKOYAMA S., NOGUCHI S., MURAKAMI N., YAMASHITA H., WATANABE S., UCHINO S., TODA M., SASAKI A., DAA T., NAKAYAMA I.

Chronic thyroiditis as a favorable prognostic factor in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 1998;8(3):197-202.

KEBEBEW E. Hereditary non-medullary thyroid cancer. *World J Surg*, 2008;32:678-682.

KNOSTMAN KAB, JHIANG SM & CAPEN CC. Genetic Alterations in Thyroid Cancer: The Role of Mouse Models. *Veterinary Pathology* 44:1–14, 2007.

KOHLGRAF K.G., GAWRON A.J., HIGASHI M., MEZA J.L., BURDIK M.D., KITAJIMA S., KELLY D.L., CAFFREY T.C., HOLLINGSWORTH M.A. Contribution of the *MUC1* tandem repeat and cytoplasmic tail to invasive and metastatic properties of pancreatic cancer cell lines. *Cancer Research*, 2003;63:5011-5020.

KUO S.F., CHAO T.C., ISUEH C., CHUANG W.Y., YANG C.H., LIN J.D. Prognosis and risk stratification in young papillary thyroid carcinoma patients. *Endocrine Journals*, 2008;55(2):269-275.

KWAK J.Y., KIM E.K., YOUK J.H., KIM M.J., SON E.J., CHOI S.H., OH K.K. Extrathyroid extension of well-differentiated papillary thyroid microcarcinoma on US. *Thyroid*, 2008;18(6):609-614.

LOH K.C, GREENSPAN F.S., DONG F., MILLER T.R., YEO P.P.B. Influence of lymphocytic thyroiditis on the prognostic outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1999;84: 453-58.

LUGLI A., ZLOBEC I., BAKER K., MINOO P., TORNILLO L., TERRACCIANO L., JASS J.R. Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status. *Journal of Clinical Pathology*, 2007;60:534-539.

MACK WJ, PRESTON-MARTIN S, DAL MASO L, GALANTI R, XIANG M, FRANCESCHI S, HALLQUIST A, JIN F, KOLONEL L, LA VECCHIA C, LEVI F, LINOS A, LUND E, MCTIERNAN A, MABUCHI K, NEGRI E, WINGREN G & RON E. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea. *Cancer Causes Control*, 2003;14:773-785.

MAGRO G., SCHIAPPACASSI M., PERISSINOTTO D., CORSARO A., BORGHESE C., BELFIORE A., COLOMBATTI A., BOTTI C., GRASSO S., BOMBARDIERI E., PERRIS R. Differential expression of mucins 1 – 6 in papillary thyroid carcinoma: evidence for transformation – dependent post – translational modifications of *MUC1 in situ*. *Journal of Pathology*, 2003;200:357-369.

MAIA A.L., WARD L.S., CARVALHO G.A., GRAF H., MACIEL R.M.B., MACIEL L.M.Z., ROSARIO P.W. VISMÁN M. Nódulos tiroidianos e cancer diferenciado da tiróide. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2007;51(5):867:893.

MAZZAFERRI E.L. & KLOOS R.T. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1447-63.

MIHAILOVIC J, STEFANOVIC L., MALESEVIC M. Differentiated thyroid carcinoma with distant metastases: probability of survival and its predicting factors. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2007;22(2):250-255.

MORGANTI S., CEDA G.P., SCCANI M., MILLI B., UGLOTTI D., PRANIPOLINI R., MAGGIO M., VALENTI B., CERESINI G. Thyroid disease in the elderly sex – related differences in clinical expression. *J Endocrinol Invest*, 2005;28(11):101-4.

NIKIFOROV Y.E. Editorial: RET/PTC rearrangement – a link between Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer... or not. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006;91(6):2040-2042.

NIKIFOROVA M.N, STRINGER J.R., BLOUGH R., MEDVEDOVIC M., FAGIN J.A., NIKIFOROV Y.E. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*, 2000;290(5489):138-41.

OYEN W.J.G., BODEI L., GIAMARILE F., MAECKE H.R., TENNVALL J., LUSTER M., BRANS B. Target therapy in nuclear medicine – current status and future prospects. *Annals of Oncology*, 2007;18:1782-1792.

PACINI F., MOLINARO E., CASTAGNA M.G., LIPPI F., CECCARELLI C., AGATE L., ELISEI R., PINCHERA A. Ablation of thyroid residues with 30 mCi I₁₃₁: A comparison of thyroid cancer patients prepared with Recombinant Human TSH or thyroid withdrawal. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002;87(9):4063-4068.

PALME C., WASEEM Z., RAZA N., ESKI S., WALFISH P., FREEMAN J. Management an outcome of recurrent well-differentiated thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130:819-824.

PATEL K., MAGHAMI E., WREESMANN V., SHAHA A., SHAH J., GHOSSEIN R., SINGH B. *MUC1* plays a role in tumor maintenance in aggressive thyroid carcinomas. *Surgery*, 2005;138:994-1002.

PELLEGRITI G., SCOLLO C., LUMERA G., REGALBUTO C., VIGNERI R., AND ANTONINO BELFIORE A. Clinical Behavior and Outcome of Papillary Thyroid Cancers Smaller than 1.5 cm in Diameter: Study of 299 Cases. *EndocrinologiaThe Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004 89(8):3713–3720.

RAHN J., SHEN Q., MAH B., HUGH J. *MUC1* initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004;279(28):29386-29390.

REYNOLDS R.M., WEIR J., STOCKTON D.L., BREWSTER D.H., SANDEEP T.C., STRACHAN M.W.J. Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. *Clinical Endocrinology*, 2005;62:156-162.

RIES L.A.G., MELBERT D., KRAPCHO M., STINCHCOMB D.G., HOWLADER N., HORNER M.J., MARIOTTO A., MILLER B.A., FEUER E.S., ALTEKRUSE S.F., LEWIS D.R., CLEGG L., EISSER M.P., REICHMAN M., EDWARDS B.K. SEER cancer statistics review 1975-2005, National Institute of Cancer, 2007. <http://seer.cancer.gov/csr/1975-2005>.

RIESCO-EIZAGUIRRE G., SANTISTEBAN P. New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. *Endocrine – Related Cancer*, 2007;14:995-977.

ROSE M.C. & OYNOW J.A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiology Review*, 2006;86:245-278.

RUBINO C, VATHAIRE F., DOTTORINI M.F., HALL P., SHVARTZ C., COUETTE J.E., DONDON M.G., ABBAS M.T., LANGLOIS C., SCHLUMBERGER M. Second

primary malignancies in thyroid cancer patients. *British Journal of Cancer*, 2003;89:1633-1644.

SANDEEP T., STRACHAN M., REYNOLDS R., BREWSTER D., SCELO C., PUKKALA E., HEMMINKI K., ANDERSON A., *et al.* Second primary cancers in thyroid cancer patients a multinational record linkage study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006;91:1819-1825.

SANDERS L.E. & CADY B. Differentiated thyroid cancer – reexamination of risk groups and outcome of treatment. *Archives of Surgery*, 1998;133:419-425.

SCHLUMBERGER M & PACINI F. *Epidemiology. Thyroid Tumors. Third Edition*, Paris: Éditions Nucléon, 2006:51-62.

SCHLUMBERGER M., CHALLETON C., DEVATHAIRE F. Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastasis from thyroid carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 1996;37:598-605.

SCHLUMBERGER M., HITZEL A, TOUBERT M. E., CORONE C., TROALEN F., SCHLAGETER M. H., CLAUSTRAT F., KOSCIELNY S., TAIEB D., TOUBEAU M., BONICHON F., BORSON-CHAZOT F., LEENHARDT L., SCHVARTZ C., DEJAX C, BRENOT-ROSSI I., TORLONTANO M., TENENBAUM F., BARDET S., BUSSIÈRE F., GIRARD J. J., MOREL O., SCHNEEGANS O., SCHLIENGER J.L.,

PROST A., SO D., ARCHAMBEAUD F., RICARD M., AND BENHAMOU E. Comparison of Seven Serum Thyroglobulin Assays in the Follow-Up of Papillary and Follicular Thyroid Cancer Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007;92(7):2487–2495.

SHERMAN S. I. Thyroid carcinoma. *Lancet*, 2003;361:501-511.

SHIH M.L., LEE J.A., HSIEH C.B., YU J.C., LIU H.D., KEBEW E., CLARK O.H., DUH Q.Y. Thyroidectomy for Hashimoto's thyroiditis: complications and associated cancers. *Thyroid*, 2008;18(7):729-734.

SHINDO M., WU J.C., PARK E., TANZELLA F. The importance of central compartment elective lymph node excision in the staging and treatment of papillary thyroid cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006;132:650-654.

SHRIME M., GOLDSTEIN D.P., SEABERG R.M., SAWKA A.M., ROTSTEIN L., FREEMAN J.L., GULLANE P.J. Cost – effective management of low – risk papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007;133(12):1245-1253.

SIPPOS J.A. & MAZAFERRI E.L. The therapeutic management of differentiated thyroid cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 2008;9(15):2677-3.

SIRAGUSA M., ZERILLI M., IOVINO F., FRANCIPANE M.G., LOMBARDO Y., RICCI-VITIANI L., GESÚ G., TODARO M., DE MARIA R., STASSI R. *MUC1* oncoproteins promotes refractoriness to chemotherapy in thyroid cancer cells. *Cancer Research*, 2007;67(11):5522-5530.

SOUZA S.L., ASSUMPÇÃO L.V.M., WARD L.S. Impact of previous thyroid autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 2003;13(5):491-495.

TARP M.A., SORENSEN A.L., MANDEL U., PAULSEN H., BURCHELL J., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., CLAUSSEN H. Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the *MUC1* tandem repeat. *Glycobiology*, 2007;17(2):197-209.

THORTON D. & SHEEHAN J. From mucins to mucus. *American Thoracic Society*, 2004;1:54-61.

TODD W.U. & WENIG B.M. Thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas: an overview of the pathology of primary and recurrent disease. *Otolaryngol Clin N Am*, 2008;41:1079-1094.

TONIATO A., BOSCHIN I., CASARA D., MAZZAROTTO R., RUBELLO D., PELIZZO M. Papillary thyroid carcinoma: factors influencing recurrence and survival. *Annals of Surgical Oncology*, 2008;15(5):1518-1522.

UCCHEDDU GM. Mucinolytic activity of thyroid extracts. *Rass Med Sarda*,1950;52(6):391-6.

VERBURG F.A., de KEISER B., LAM M.G., de KLERK J.M., LIPS C.J., BOREL-RINKES I.H., VAN ISSELT J.W. Persistent disease in patients with papillary thyroid carcinoma and lymph node metastases after surgery and iodine-¹³¹ ablation. *World Journal of Surgery*, 2007;12:2309-14.

VINI L., HYER S.L., MARSHAL J. Long – term results in elderly patients with differentiated thyroid cancer. *Cancer*, 2003;97:2733-2742.

WADA N., NAKAYAMA H SUGANUMA N., MASUDO Y., RINO Y., MASUDA M., AND IMADA T. Prognostic Value of the Sixth Edition AJCC/UICC TNM Classification for Differentiated Thyroid Carcinoma with Extrathyroid Extension. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007; 92(1):215–218

WANG T., DUBNER S., SZNYTER L., HELLER K. Incidence of metastatic well – differentiated thyroid cancer in cervical lymph nodes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004;130:110-113.

WARD L.S. & ASSUMPÇÃO L.V.M. Thyroid Cancer: prognostic factors and treatment. *Arq Bras Endo Metab* 2004; 48(1):126-136.

WARTOFSKY L., NOSTRAND D.V. Thyroid Cancer. In Wartofsky L., editor. *Thyroid Cancer*, 2d ed. New Jersey: Human Press Inc, 2006: 63-83.

WREESMANN V.B., SIECZKA E.M., SOCCI N.D., HEZEL M., BELBIN T.J., CHILDS G., PATEL S.G., PATEL K.N., TALLINI G., PRYSTOWSKY M., SAHA A.R., KRAUS D., SHAH J.P., RAO P.H., GHOSSEIN R., SINGH B. Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies *MUC1* as an independent prognostic marker. *Cancer Research*, 2004;64:3780-89.

ZAYDFUDIM V., FEURER I., GRIFFIN M.R., PHAY J. The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Surgery* 2008;144:1070-8.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

TABELA 1. Mucinas humanas que possuem domínio RT, localização cromossômica e classificação quanto ao eixo das estruturas protéicas de MUC

MUCINA	CROMOSSOMA	CLASSIFICAÇÃO
MUC1	1q21-q24, 1q21	Ligada à membrana
MUC 2	11p15.5	Secretora rica em cisteína
MUC 3 A	7q22	Ligada à membrana
MUC 3B	7q22	Ligada à membrana
MUC 4	3q29	Ligada à membrana
MUC 5AC	11p15.5	Secretora rica em cisteína
MUC 5B	11p15.5	Secretora rica em cisteína
MUC 6	11p15.5	Secretora rica em cisteína
MUC 7	4q13.3	Secretora pobre em cisteína
MUC 8	12q24.3	Secretora pobre em cisteína
MUC 9	1p13	Secretora pobre em cisteína
<i>MUC11</i>	7q22	Ligada à membrana
<i>MUC12</i>	7q22	Ligada à membrana
<i>MUC13</i>	1p13	Ligada à membrana
<i>MUC16</i>	19q13.2	Ligada à membrana
<i>MUC17</i>	7q22	Ligada à membrana
<i>MUC19</i>	12q12	Secretora rica em cisteína
MUC 20	3q29	Ligada à membrana

APÊNDICE 2

Tabela 4: Sistema TNM sexta edição (WADA N, et al, 2007)

T1	T2	T3	T4	N1a	N1b	M1
≤ 2cm	2 – 4 cm	> 4cm	Qualquer tamanho	VI	Cervical	Meta a distância
T1a ≤ 1cm	Limitado a tiróide	Limitado a tiróide	Extensão extratiroideiana		Mediastino superior	
T1b 1 – 2 cm		Invasão mínima	T4a: SC Laringe Traquéia Esôfago n.laringeo			
			T4b: Vertebral Carótida Mediastino			
Tx: Desconhecido				Nx: Desconhecido		Mx: desconhecido

APÊNDICE 3

Tabela 5. Estratificação de Risco do Pós – Operatório de Pacientes com CDT baseada na ressecção tumoral e nas características do tumor definidas pela classificação do TNM

Fator/ Risco Prognóstico	T	N	M	Ressecção Cirúrgica
Muito Baixo Risco	T1a ou T1b Único	N0	M0	Completa
Baixo Risco	T1 Multifocal T2	N0	M0	Completa
Alto Risco	T3 ou T4	N1	M1	Incompleta

APÊNDICE 4

TABELA 6. Relação entre os dados clínicos dos pacientes e a evolução clínica

	Livre de doença % (n)	Má evolução % (n)	p valor
Sexo: Feminino	72 (108)	9,3 (14)	0,0343
Masculino	13,3 (20)	5,33 (8)	
Cor: Branco	72,6 (109)	12,6 (20)	0,740
Não Branco	13,4 (19)	1,4 (2)	
Idade: <45	51,3 (77)	51,3 (9)	0,091
≥45	34 (51)	34 (13)	
Tabagismo: sim	26,2 (33)	4,8 (6)	0,857
não	61,9 (78)	7,1 (9)	
Ca Família: sim	46,6 (41)	1,2 (1)	0,031
não	43,2 (38)	9 (8)	
Ca Mama (2º tu)	7,9 (7)	1,1 (1)	0,589
Segundo Ca	11,1(10)	2,2 (2)	0,343
Estadio: 1	22,1 (33)	1,3 (2)	0,0086
2	19,4 (29)	0,6 (1)	
3	43,6 (65)	12,8 (19)	
Meta Diagn: sim	30,9 (46)	10,8 (16)	0,0007
não	55,1 (82)	3,2 (5)	
Meta Evol: sim	16,7 (25)	14 (21)	< 0,0001
não	68,7 (103)	9,7 (1)	

APÊNDICE 5

Tabela 7. Relação entre os dados do tumor e a evolução clínica

Dados do Tumor	Livre de Doença % (n)	Má evolução % (n)	p valor
CPC	52,7 (79)	10 (15)	0,5626
CPCA	7,3 (11)	1,3 (2)	1,0
CPVF	23,3 (35)	2,6 (4)	0,3924
CPED	0	2 (3)	-
CPOn	0,66 (1)	0	-
Tiroidite :sim	31,1 (46)	1,3 (2)	0,0155
não	54,7 (81)	12,9 (19)	
Invasão :sim	49,1 (61)	12,9 (16)	0,0113
não	36,3 (45)	1,7 (2)	
Tamanho :<2cm	53,3 (79)	4 (6)	0,0002
2-4cm	22,3 (33)	3,4 (5)	
>4 cm	10,1 (15)	6,7 (10)	
Multifocal :sim	37,3 (56)	6,7 (10)	0,8817
não	48 (72)	8 (12)	
Cápsula :sim	13,3 (20)	2,6 (4)	0,7243
não	27,3 (41)	4 (6)	

APÊNDICE 6.

Tabela 8. Relação entre os dados clínicos e a invasão tumoral

Dados Clínicos	Com Invasão % (n)	Sem Invasão % (n)	p valor
Sexo: Feminino	49,9 (68)	35,1 (51)	0,0614
Masculino	13,8 (20)	4,2 (6)	
Cor: Branco	51,4 (74)	38,2 (55)	0,0281
Não Branco	9 (13)	1,4 (2)	
Idade: <45	32,4 (47)	20,7 (30)	0,9270
≥45	28,3 (41)	18,6 (27)	
Tabagismo: sim	17,1 (20)	14,5 (17)	0,6330
não	40,1 (47)	28,2 (33)	
Ca Família: sim	24,7 (26)	25,7 (27)	0,3752
não	28,5 (30)	21 (22)	
Ca Mama (2º tu)	3,7 (4)	4,6 (5)	0,7292
Segundo Ca	8,3 (9)	4,6 (5)	0,4266
Estadio: 1	9 (13)	16 (23)	0,0001
2	7,7 (11)	12,6 (18)	
3	44 (63)	10,5 (15)	
Metástase D.: sim	30,6 (44)	7,6 (11)	0,0003
não	30,6 (44)	31,2 (45)	
Metástase Ev sim	19,8 (26)	6,8 (9)	0,0610
não	41,2 (54)	32 (42)	

APÊNDICE 7

TABELA 9: Relação entre os dados tumorais e invasão tumoral

Dados do Tumor	Com Invasão % (n)	Sem Invasão % (n)	p valor
CPC	38 (55)	22,7 (33)	0,8942
CPCA	5,3 (8)	1,3 (2)	0,3154
CPVF	15,3 (23)	12,6 (19)	0,4895
CPED	2 (3)	0	-
CPOn	0	0,66 (1)	-
Tiroidite:sim	13,3 (20)	16 (24)	0,0132
não	45,3 (68)	22 (33)	
Tamanho:<2cm	30 (45)	24,6 (37)	0,0916
2-4cm	16 (24)	10 (15)	
>4 cm	11,3 (17)	2,6 (4)	
Multifocal:sim	24,6 (37)	11,3 (17)	0,1271
não	34 (51)	26,6 (40)	
Cápsula:sim	12 (18)	8,6 (13)	0,5169
não	26 (39)	21 (21)	

APÊNDICE 8

Tabela 10. Imunoistoquímica de *MUC1* e as relações com evolução clínica, invasão tumoral, morte pelo tumor.

POSITIVIDADE DADOS	MUC1 - NEGATIVO	MUC1 – POSITIVO I	MUC1 – POSITIVO II	MUC1 – POSITIVO III	MUC1 – POSITIVO IV	p valor
LIVRE DE DOENÇA % (n)	15,7 (23)	19,1 (28)	14,3 (21)	10,9 (16)	24,3 (37)	0,9049
MÁ EVOLUÇÃO % (n)	2 (3)	2,7 (4)	2 (3)	1,37 (2)	6,1 (9)	
COM INVASÃO % (n)	9,9 (14)	12,7 (18)	10,6 (15)	7,8 (11)	19,8(28)	0,9736
SEM INVASÃO % (n)	7,8 (11)	7 (10)	7 (10)	4,2 (6)	12,7 (18)	
MORTE PELO TUMOR % (n)	0,68 (1)	-	1,37 (2)	-	2,7 (4)	0,6631

APENDICE 9

TABELA 11. Imunoistoquímica de *MUC1* e as relações com evolução clínica, invasão tumoral, morte pelo tumor.

INTENSIDADE DADOS	MUC1 - NEGATIVO	MUC1 – FRACO	MUC1 – MODERADO	MUC1 – FORTE	p valor
LIVRE DE DOENÇA % (n)	15, 7 (23)	17,3 (26)	36,6 (55)	14 (2)	0,4714
MÁ EVOLUÇÃO % (n)	2 (3)	4,7 (7)	3,4 (5)	4 (6)	
COM INVASÃO % (n)	9,9 (14)	17 (25)	19,7 (29)	12,9 (19)	0,1175
SEM INVASÃO % (n)	7,8 (11)	6,1 (9)	18,3 (27)	6,1 (9)	
MORTE PELO TUMOR % (n)	0,68 (1)	1,37 (2)	0,68 (1)	2 (3)	0,6631

APÊNDICE 10. Tabela 12. Relação da expressão de *MUC1* por Real Time-PCR com os dados clínicos e tumorais

Dados Clínicos	<i>MUC1</i> > 3 % (n)	<i>MUC1</i> < 3 % (n)	p valor
Sexo: Feminino	45,3 (34)	38,6 (29)	0,223
Masculino	5,3 (4)	10,6 (8)	
Idade: <45	24 (18)	28 (21)	0,491
≥45	26,6 (20)	21,3 (16)	
Estadio: 1	18 (14)	16 (12)	0,353
2	13,3 (10)	8 (6)	
3	18 (14)	25,3 (19)	
Metástase D sim	8 (6)	20 (15)	0,0216
não	42,6 (32)	29,3 (22)	
Metástase Ev sim	4,4 (3)	7,35 (5)	0,7102
não	44,1(30)	44,1(30)	
CPC	29,3 (22)	38,6 (29)	0,0830
CPVF	21,3 (16)	10,6 (8)	
Tiroidite sim	26,6 (20)	16 (12)	0,1032
não	24 (18)	33,3 (25)	
Invasão sim	22,6 (17)	32 (24)	0,1057
não	28 (21)	17,3 (13)	
Multifocal sim	13,3 (10)	17,3 (13)	0,4596
não	37,3 (28)	32 (24)	
Tamanho < 2cm	38,6 (29)	34,6 (26)	0,2911
2 a 4 cm	9,3 (7)	12 (9)	
>4cm	2,6 (2)	2,6 (2)	