

MARJORY ALANA MARCELLO

MARCADORES DE MALIGNIDADE PARA NÓDULOS DE TIRÓIDE

CAMPINAS

2011

MARJORY ALANA MARCELLO

MARCADORES DE MALIGNIDADE PARA NÓDULOS DE TIRÓIDE

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas

Orientadora: Profa. Dra Laura Sterian Ward

Co-orientador: Prof. Dr. André Lopes Carvalho

CAMPINAS

2011

ii

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

M333m Marcello, Marjory Alana
 Marcadores de malignidade para nódulos de tireóide /Marjory
 Alana Marcello -- Campinas, SP : [s.n.], 2011

Orientadores : Laura Sterian Ward; André Lopes Carvalho
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tireóide. 2. Marcadores moleculares. 3. Diagnóstico. 4.
Tireóide-tumores. I. Ward, Laura Sterian. II. Carvalho, André Lopes.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

Título em inglês: Malignancy markers for thyroid nodules

Keywords: • Thyroid
 • Molecular markers
 • Diagnosis
 • Tumors-Thyroid

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de Concentração: Ciências Básicas


Banca examinadora:

Prof. Dr. Laura Sterian Ward
Prof. Dr. Jose Barreto Carvalheira
Prof. Dr. Antonio Hugo José Froés Marques Campos

Data da defesa: 28-02-2011

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Marjory Alana Marcello

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



Membros:

1. Prof. Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos



2. Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira



3. 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: 28/02/2011

Dedico esta tese aos meus pais: **Elza** (*in memoriam*) e **Dirlei**, por terem me dado desde cedo os estímulos que me fariam desejar este trabalho, além de serem exemplos de caráter e amor.

Às minhas irmãs: **Marusha** e **Marlise**, por estarem ao meu lado sempre e independentemente de qualquer coisa. Por me apoiarem, acreditarem e se orgulharem de mim.

À **Dra. Laura**, por tudo o que tem feito por mim, como pessoa e futura pesquisadora. Pela oportunidade que me ofereceu, pelo exemplo que me dá todos os dias, pelo carinho que me dedica.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de todas as coisas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Laura Sterian Ward, uma fonte de inspiração. Agradeço por me permitir fazer parte de seu grupo, por sua disponibilidade, por todos os conselhos, puxões de orelha, ensinamentos, apoio, incentivos e compreensão. A senhora é uma mãe para mim!

Aos amigos e colegas do Laboratório GEMOCA: Rita, Natassia, Aline Castaldi, Carolina, Raquel, Aline Carolina, Angélica, Marielly, Jacqueline, Willian e Peterson. Agradeço pelos momentos juntos, pela paciência, ensinamentos, diversão, carinho e amizade. Muito obrigada! Um agradecimento especial à Elaine, Lucas e Mariana (minha organizadora). Sem vocês tudo seria muito mais difícil e sem graça. É um prazer e uma grande satisfação tê-los ao meu lado e contar com sua amizade!

Ao Dr. André Lopes Carvalho, meu co-orientador, por seu inestimável apoio, sua paciência, sabedoria e solicitude. Sem sua participação e ajuda esta tese não seria possível.

À toda a equipe do Hospital de Câncer de Barretos, realmente o hospital do amor e um exemplo de instituição. Em especial, agradeço à Naiara da Biologia Molecular; à Silvana, Allini e Kátia do NAP; ao pessoal do SAME e ao Cleyton da bioestatística.

A todo o pessoal dos laboratórios vizinhos pelas inúmeras “ajudinhas” e “favorzinhos”, especialmente Viviane, Luisa, Helen e Fabio Conte. Às meninas, agradeço

pelos bons momentos e por deixarem tudo mais leve e agradável. Ao Fábio, por todos os ensinamentos, risos e a paciência de sempre.

À Joseane, pelas muitas vezes que a incomodei com perguntas sobre o Real Time e ela pacientemente ouviu e me ajudou, além de várias outras conversas agradáveis.

À Dra Elba Etchebehere e à residente Aline Leal, ambas da Medicina Nuclear do HC-UNICAMP por permitirem meu acesso a Medicina Nuclear, aos pacientes e dados, se mostrando disponíveis para me ajudar e permitindo a realização desta tese.

A todos do laboratório Limed, especialmente ao Dr Bruno Geloneze pelos conselhos, incentivos, críticas, sugestões e, principalmente, por abrir as portas de seu laboratório para que fizéssemos os ensaios de ELISA; à doutoranda Ana Carolina Vasquez pelos controles; e ao querido Antonio, essencial para que essa tese se desenvolvesse, obrigada pela ajuda e carinho.

A todos os pacientes e voluntários que, doando um pouco de si, tiveram o desprendimento e a generosidade de possivelmente ajudar não a si mesmos, mas a outros.

À Dra Margarete Costa, uma das fortes responsáveis e incentivadoras à minha entrada no mundo da biologia. Suas palavras de carinho e incentivo são sempre lembradas, mestra!

À Dra Iscia Cendes e Dra Cláudia Morelli, por terem me dado a primeira oportunidade de estar num laboratório de pesquisa e por me darem exemplos de ética e dedicação ao trabalho.

À minha mãe, Elza, (*in memoriam*) por ter sonhado este sonho comigo e ter participado da idealização do projeto desta tese. Infelizmente, ela não pôde estar presente neste momento, mas a carrego comigo sempre e para sempre.

Ao meu pai, Dirlei, por ter me incentivado a entrar na carreira acadêmica e ter sonhado com isto até mesmo antes de mim. Obrigada por ser meu porto seguro.

Às minhas irmãs Marusha e Marlise, por compreenderem meus momentos de mau humor, minha ausência, meu nervoso, minhas angústias. Por tornarem a minha vida mais gostosa de ser vivida. Por acreditarem em mim. Por serem meu refúgio e meu norte. Amo vocês!

Ao Emerson, por ter dividido tantas experiências comigo, me incentivado e me mostrado que eu era capaz de superar as dificuldades.

À Daniele Correa e Juliana Higa, por terem me incentivado e me dado tanto apoio quanto podiam, por terem me ensinado a ver as coisas de outra forma, por terem me proporcionado experiências impagáveis e por terem compreendido minhas ausências. Obrigada, amigas!

Aos meus amigos de infância, Ben Hur, Elton, Guilherme e Matheus, por me permitirem preservar a minha essência, por entenderem minhas ausências e por acreditarem em minha capacidade sempre. Alguns amigos são para sempre!

Ao Willian (Chuchu) e Pet, pela amizade que me dedicaram, pelas acolhidas, pela paciência, enfim, por melhorarem meu período final (e estressante) de tese.

Às minhas amigas de república, especialmente a Marília, por me proporcionarem ótimos momentos, por entenderem minhas ausências, chatices, reclamações, manias e, mesmo assim, sorrirem pra mim.

A todos do CNA Ponte Preta, funcionários e alunos, que acompanharam, se interessaram, e torceram por mim. Agradeço a todos, pois vocês melhoraram períodos muito difíceis pra mim!

À FAPESP e CNPq, pois sem o apoio financeiro e bolsa, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

“De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando.

A certeza de que precisamos continuar.

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto devemos fazer da interrupção, um caminho novo.

Da queda, um passo de dança.

Do medo, uma escada.

Do sonho, uma ponte.

Da procura, um encontro”.

Fernando Sabino

RESUMO

Nódulos de tiróide são palpados em cerca de 10% da população e diagnosticados em mais de 50% da população usando-se a ultrassonografia. No entanto, apenas 0,01% são câncer. Por outro lado, o Câncer Diferenciado da Tiróide (CDT) é a neoplasia endócrina mais comum e suas taxas de incidência vem crescendo pelo mundo. Urge, portanto, estabelecer marcadores capazes de identificar malignidade em nódulos na população. Objetivamos, neste trabalho, investigar a utilidade clínica de BRAF, TPO, GAL-3, VEGF e VEGF-C como marcadores para o CDT. Foram utilizados 165 pacientes com CDT; 31 pacientes com nódulos Benignos e 216 Controles. Utilizamos ensaios de PCR-RFLP para a pesquisa da mutação de BRAF, RT-PCRq para dosar TPO e ELISA para dosar VEGF, VEGF-C e Galectina-3 circulantes. A identificação da mutação de *BRAF* em células tiroidianas circulantes não foi possível com a metodologia por nós empregada. Não encontramos expressão de TPO em sangue periférico de pacientes com CDT. O nível sérico de Gal-3 diferiu entre os grupos CDT, Benigno e Controles, mas não diferenciou nódulos benignos de malignos ($p=0,884$). O nível sérico de VEGF pôde diferenciar os pacientes com CDT de pacientes com nódulos Benignos ($p=0,041$), assim como diferenciou CDT dos controles ($p=0.015$), embora não tenha grande poder como marcador único. Os níveis séricos de VEGF-C distinguem pacientes com nódulos Benignos, Malignos e Controles ($p=0,025$). Dentre estes, distinguem pacientes com CDT dos Controles ($p=0,046$), porém não dos nódulos Benignos ($p=0.242$). Os níveis séricos de Gal-3, VEGF e VEGF-C parecem discriminar alguns grupos em relação a variáveis clínico-patológicas, porém não há indicação de que possam ser usados como marcadores para o CDT, uma vez que seus poderes preditivos positivo e negativo não são bons. Concluimos que, embora possam auxiliar no diagnóstico, nenhum dos marcadores estudados é promissor do ponto de vista clínico.

SUMMARY

Thyroid nodules may be diagnosed in about 10% of the population and half of the population if they're examined through ultrasonography. However, only 0.1% of those nodules are cancer. On the other hand, Differentiated Thyroid Cancer (DTC) is the most common endocrine malignancy and its incidence rate is increasing worldwide. This fact creates an urgent need for new markers that might be used in a large scale to diagnose thyroid nodules malignancy. We aimed to investigate the clinical utility of BRAF, TPO, Gal-3, VEGF and VEGF-C as markers for the CDT. We studied 165 patients with DTC, 31 patients with benign tumors and 216 controls. We used PCR-RFLP to investigate the presence of BRAF mutation, RT-PCRq to quantify TPO mRNA and ELISA to quantify VEGF, VEGF-C and Gal-3 in circulation. The identification of BRAF mutation in thyroid cells was not possible with the methodology employed. We didn't find any expression of TPO in peripheral blood of patients with DTC. The serum levels of Gal-3 differed among groups DTC, Benign and Controls, but did not differentiate benign and malignant tumors ($p = 0.884$). The serum levels of VEGF could differentiate patients with DTC from patients with benign nodules ($p = 0.041$) and DTC differed from controls ($p = 0.015$), although this test didn't have a great predictive power as a single marker. Serum levels of VEGF-C distinguished patients with benign nodules, malignant tumors and controls ($p = 0.025$). It distinguished patients with DTC from Controls ($p = 0.046$) but not from the benign tumors ($p = 0.242$). Serum levels of Gal-3, VEGF and VEGF-C seem to discriminate some groups in what concerns clinical and pathological variables, but there is no indication that they can be used as markers for the CDT, as its positive and negative predictive powers are not high. We conclude that, although they might support the diagnosis, none of the markers studied is promising in a clinical perspective.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| acTg | Anti-Tiroglobulina |
| acTPO | Anti-Tireoperoxidase |
| AFP | Alfa Fetoproteína |
| AMPc | Adenosina Monofosfato Cíclico |
| A-RAF | Do inglês v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| Bcl-2 | Do inglês (B-cell CLL/lymphoma 2 |
| BRAF | Do inglês (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| cDNA | Acido Desoxirribonucléico complementar |
| CDT | Câncer Diferenciado da Tiróide |
| CEA | Antígeno Carcino Embriogênico |
| CF | Carcinoma Folicular |
| CK-19 | Citoqueratina-19 |
| CMT | Carcinoma Medular de Tireóide |
| CP | Carcinoma Papilífero |
| C-RAF | Do inglês proto-oncogene serine/threonine protein kinase |
| Ct | Do inglês Threshold Cycle |
| DIT | Diodotirosina |
| DNA | Acido Desoxirribonucléico |
| DRC | Domínio de Reconhecimento de Carboidratos |

| | |
|-------------------|--|
| ELISA | Do ingles Enzyme-linked immunosorbent assay) |
| FCM | Faculdade de Ciências Medicas |
| GAL-1 | Galectina-1 |
| GAL-3 | Galectina-3 |
| GAPDH | Do inglês glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase |
| GEMOCA | Laboratório de Genética Molecular do Câncer |
| HBME-1 | Hector Battifora Mesothelial cell |
| HC | Hospital da Clinicas |
| HCB | Hospital de Câncer de Barretos |
| HIF | Do inglês hipoxiainducible factor |
| H-Ras | Do inglês v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IMC | Índice de Massa Corpórea |
| KCl | Cloreto de Potassio |
| KDa | Quilodaltons |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Densidade |
| LIMED | Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes |
| MAPK | Do inglês Mitogen-Activated Protein Kinases |
| MCP | Microcarcinoma Papilífero |
| MIT | Monoiodotirosina |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| mRNA | Mensageiro do Acido Ribonucleico |
| NCI-USA | Do inglês National Cancer Institute |

| | |
|------------|--|
| NIS | Co-Transportador Sódio-iodeto |
| PAAF | Punção Biópsia com Agulha Fina |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PCR-RFLP - | Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição |
| PIGF | Do inglês Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis, Class F |
| PKA | Proteína Cinase A |
| PSA | Antígeno Específico da Próstata |
| p53 | Do inglês Protein p53 |
| qPCR | PCR - quantitativo |
| qRT-PCR | Reações de PCR quantitativa por Real Time |
| RAF-1 | Do inglês v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 |
| RAS | Vírus Sarcoma de Rato |
| RET/PTC | Do inglês ret proto-oncogene/cancer papilifero de tiróide |
| RFLP | Restrição Enzimática |
| RIT | Radioiodoterapia |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| ROC | Do inglês Receiver Operating Characteristics |
| RT-PCR | Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa |
| SDS | Do inglês Dodecil Sulfato de Sódio |
| SNPs | Do inglês, Single Nucleotide Polimorphysm |
| T3 | Triiodotironina |
| T4 | Tiroxina |
| Tg | Tiroglobulina |

| | |
|--------------|--|
| TNM | Tumor Nódulo Metastase |
| TPO | Tiroperoxidase |
| Tris HCl | Do inglês Hyroxy Methyl Amino Methane Hidrocloro |
| TSH | Hormônio Estimulante da Tiróide |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas |
| UV | Luz Ultravioleta |
| VEGF | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |
| VEGF-A | Fator de Crescimento Endotelial Vascular A |
| VEGF-B | Fator de Crescimento Endotelial Vascular B |
| VEGF-C | Fator de Crescimento Endotelial Vascular C |
| VEGF-D | Fator de Crescimento Endotelial Vascular D |
| 18FDGPET | Tomografia por Emissão de Pósitrons 18F-Fluorodeoxiglicose |
| 18FDG-PET/CT | Tomografia Computadorizada |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Descritiva dos tipos histológicos dos casos malignos (CDT) incluídos no estudo..... | 26 |
| Tabela 2. Reagentes usados na reação de PCR para BRAF..... | 33 |
| Tabela 3. Reagentes usados na reação de Restrição Enzimática para BRAF..... | 34 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Taxa de incidência de Câncer de tiróide em homens segundo município. Taxa ajustada por idade. (COELI, 2005)..... | 04 |
| Figura 2. Taxa de incidência de Câncer de tiróide em mulheres segundo município. Taxa ajustada por idade. (COELI, 2005) | 04 |
| Figura 3. Cascata RAS-RAF-MAPK, da qual participa o gene BRAF que, quando mutado, ativa ainda mais esta via..... | 12 |
| Figura 4. Via de produção dos hormônios tireoidianos, com a participação da proteína TPO...15 | |
| Figura 5. Galectina-3 e suas diferentes vias de ligação, sendoq eu muitas destas levam a progressão tumoral..... | 17 |
| Figura 6. As cinco isoformas de VEGF e seus efeitos biológicos na proliferação, migração, sobrevivência e angiogênese..... | 20 |
| Figura 7. Protocolo de seguimento dos pacientes no ambulatório de Câncer da Tireóide..... | 28 |
| Figura 8. Gel de agarose 2% mostrando a amplificação da região de interesse do gene BRAF..... | 32 |
| Figura 9. Gel de restrição do gene BRAF, evidenciando indivíduos de genótipo selvagem (bandas de 124pb e 87 pb) e indivíduos mutados (224pb)..... | 34 |
| Figura 10. Curva padrão da quantificação absoluta de TPO..... | 42 |
| Figura 11. Curvas de amplificação do controle endógeno GAPDH e de TPO em tumores tireoidianos, indicando que houve amplificação de ambos os genes..... | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Box plot mostrando os valores de expressão de Galectina-3 em soro de Pacientes portadores de CP, CF, Nódulos Benignos e Indivíduos Controles..... | 45 |
| Figura 13. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da dosagem de Gal-3..... | 46 |
| Figura 14. Box plot mostrando os valores de expressão de VEGF em soro de Pacientes portadores de CP, CF, Nódulos Benignos e Indivíduos Controles..... | 48 |
| Figura 15. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da dosagem de VEGF..... | 49 |
| Figura 16. Box plot mostrando os valores de expressão de VGF-C em soro de Pacientes portadores de CP, CF, Nódulos Benignos e Indivíduos Controles..... | 51 |
| Figura 17. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da dosagem de VEGF-C..... | 52 |
| Figura 18. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da análise dos três marcadores em conjunto..... | 53 |

SUMÁRIO

| | PÁGINA |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 1.1. Câncer de tiróide – Demografia de uma pandemia..... | 02 |
| 1.2. Importância do diagnóstico de câncer diferenciado em nódulos de tiróide..... | 06 |
| 1.2.1. Avaliação Laboratorial Do Nódulo de Tiróide..... | 06 |
| 1.3. Marcadores tumorais..... | 07 |
| 1.4. Gene <i>BRAF</i> | 10 |
| 1.5. Tiroperoxidase (TPO)..... | 13 |
| 1.6. Galectina-3..... | 16 |
| 1.7. Fator de Crescimento Endotelial Vascular – Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 23 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 24 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 24 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1. Casuística..... | 26 |
| 3.1.1 Pacientes com CDT | 27 |
| 3.1.1.1. Seguimento..... | 28 |
| 3.1.2. Pacientes com Nódulos Benignos..... | 29 |
| 3.1.3. Indivíduos Controle..... | 29 |
| 3.2. Metodologia..... | 30 |
| 3.2.1. Estudo do Gene <i>BRAF</i> | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1.1. Extração de DNA de Leucócitos..... | 31 |
| 3.2.1.2. Extração de RNA de Sangue Periférico..... | 31 |
| 3.2.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene <i>BRAF</i> | 31 |
| 3.2.1.4. Restrição Enzimática do Gene <i>BRAF</i> | 33 |
| 3.2.2. PCR quantitativo (qPCR) (Real Time PCR) para análise da expressão do Gene TPO..... | 35 |
| 3.2.2.1. Extração de RNA de sangue periférico..... | 35 |
| 3.2.2.2. Reações de PCR quantitativa (qRT-PCR)..... | 35 |
| 3.2.2.3. Validação da eficiência dos genes de interesse..... | 36 |
| 3.2.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 38 |
| 3.2.3.1. Protocolo Geral ELISA..... | 38 |
| 3.2.4. Análise Estatística..... | 39 |
| 4. RESULTADOS..... | 40 |
| 4.1. Gene <i>BRAF</i> | 41 |
| 4.2. TPO..... | 41 |
| 4.3. Galectina - 3..... | 43 |
| 4.4. VEGF..... | 46 |
| 4.5. VEGF - C..... | 49 |
| 4.6. Combinação de Gal-3, VEGF e VEGF-C..... | 52 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 54 |
| 6. RESUMO DOS ACHADOS..... | 60 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 62 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 64 |
| 9. ANEXOS..... | 76 |

1 - INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE TIRÓIDE – DEMOGRAFIA DE UMA PANDEMIA.

A tiróide é uma pequena glândula situada na região cervical anterior, responsável pela produção de dois hormônios, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do ser humano e pela manutenção do equilíbrio metabólico do organismo adulto.

Esta glândula é freqüentemente local de formação de nódulos. A prevalência de nódulos tiroidianos varia de acordo com o método de rastreamento utilizado, passando de cerca de 1% nos homens e 5% das mulheres que vivem em condições de suficiência de iodo, quando o diagnóstico é apenas clínico (1-4), para 76% quando se utilizam métodos de imagem como a ultrassonografia (4). Dois grandes estudos populacionais, o de Whickham na Inglaterra (5) e o de Framingham nos Estados Unidos (6), descrevem, respectivamente, nódulos solitários palpáveis em 5,3% das mulheres e 0,8% dos homens, e 6,4% das mulheres e 1,6% dos homens. No entanto, em regiões onde a ingestão de iodo é baixa, a prevalência pode ser ainda mais elevada. A prevalência de nódulos em autópsia, na literatura, varia entre 8 e 65%, dado muito próximo ao que é detectado com exames de imagem (7-9). Trabalhos de nosso grupo mostram que também em nosso meio esta é a prevalência de nódulos em material de cirurgia por lesões tiroidianas benignas e em autópsias (8, 10). Se utilizarmos um instrumento muito mais sensível do que as nossas mãos, como a ultra-sonografia, ou a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e outros métodos de imagem, a prevalência do nódulo da tiróide atinge cerca de metade da população (11) podendo chegar a mais de 80% dos idosos (12). Dados nacionais são poucos, mas tudo sugere que também em nosso meio a prevalência de nódulos também é muito elevada (13).

Nódulos cervicais aparecem como manifestação de uma série de doenças neoplásicas, infecciosas e inflamatórias além de obrigarem ao diagnóstico diferencial com anomalias embriológicas como o cisto de ducto tiroglossos e as ectopias tiroidianas. A tabela 1 resume os principais diagnósticos diferenciais do nódulo cervical.

Menos de 5% dos pacientes com nódulos que são examinados em consultórios médicos são portadores de câncer de tireóide (CDT) (11, 14). No entanto, o CDT tem aumentado em diferentes regiões do mundo nas últimas décadas (15) e, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer é o câncer mais comum da região da cabeça e pescoço e três vezes mais frequente no sexo feminino (16). O INCA estima que o câncer de tireóide tenha sido responsável por 12.9% de todas as neoplasias registradas no sexo feminino e por 3.2% das neoplasias do sexo masculino em 2009 (16). Registros nacionais de câncer e publicações brasileiras confirmam o aumento na incidência do CDT, particularmente entre as mulheres, embora a mortalidade pelo CDT esteja diminuindo (17-18)

Além disso, a prevalência do câncer de tireóide apresenta grande variação geográfica. No Japão atinge 1.4/100.000 habitantes e no Kuwait relata-se que acomete 10,5% das mulheres (19-20). Dados brasileiros também mostram esta grande variedade na incidência em diversos estados do país (17). Sem dúvida, parte destes dados deve estar relacionada ao melhor acesso ao Sistema Único de Saúde e a melhores meios de diagnóstico, como no estado de São Paulo. No entanto, a grande variedade também em outros estados de similar nível sócio-econômico-cultural e similar qualidade de serviços de atendimento em saúde, como mostram as figuras 1 e 2 abaixo, indica que outros fatores também devem contribuir para tal divergência na incidência.

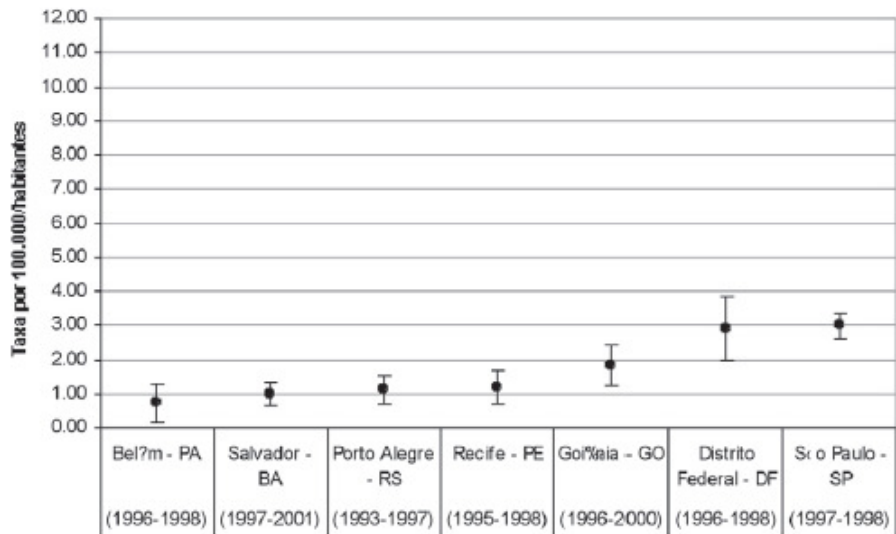


Figura 1. Taxa de incidência de Câncer de tiróide em homens segundo município. Taxa ajustada por idade (17).

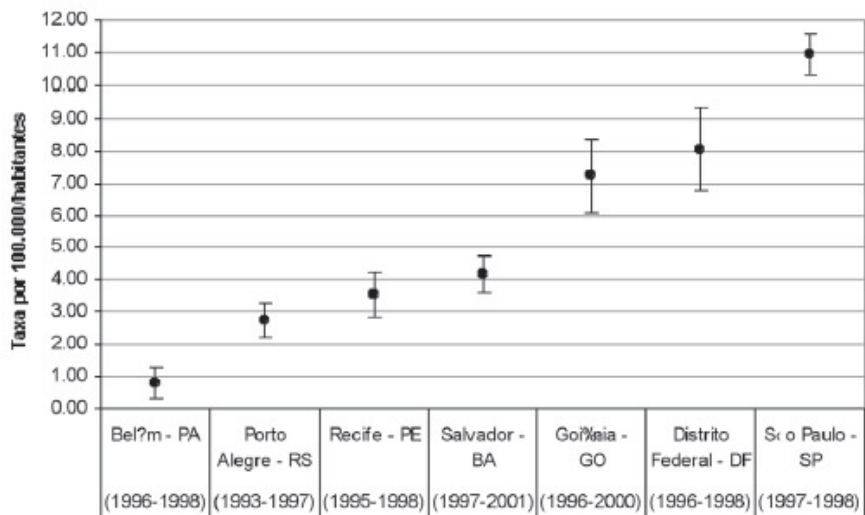


Figura 2. Taxa de incidência de Câncer de tiróide em mulheres segundo município. Taxa ajustada por idade (17).

Não há como negar que estamos diagnosticando mais casos e tratando melhor dos pacientes com câncer de tireóide, mas outros fatores também podem estar contribuindo para este aumento de prevalência. (21). Sem dúvida, o fato de estarmos diagnosticando mais casos de tumores pequenos, muitas vezes microcarcinomas que talvez nunca evoluíssem para tumores clinicamente detectáveis, contribui para a elevada incidência e baixa mortalidade do CDT. Evidências de nosso grupo mostram que microtumores acometem cerca de 8% da população e que fatores relacionados à reação inflamatória do organismo podem ser importantes na progressão clínica destes microcarcinomas (8, 10). O seguimento de microcarcinomas na população japonesa mostra que, realmente, menos de 16% deles aumenta mais de três mm em 10 anos de seguimento e que a maior parte das micro lesões permanece estável, e/ou até diminui de tamanho (22).

Dentre os fatores de risco para câncer de tireóide temos a radiação ionizante, predisposição familiar, ingestão deficiente de iodo, fatores hormonais e reprodutivos, fatores étnicos e geográficos, dieta e drogas. Nosso laboratório tem demonstrado que o perfil genético para a herança de genes codificadores de uma série de enzimas de detoxificação também é fator de predisposição ao câncer diferenciado da tireóide (23-28) Além disso, o câncer pode ser relacionado com outras doenças, como o Diabetes Mellitus tipo 2, que é considerado um grupo de distúrbios metabólicos do metabolismo de carboidratos, e a obesidade, que consiste em um aumento de peso, acompanhada do aumento da porção LDL (lipoproteína de baixa densidade) do colesterol, além do aumento da glicose no sangue (29). Essas doenças podem estar relacionadas às inúmeras mudanças no estilo de vida, caracterizadas por uma vida agitada, com um consumo calórico excessivo e uma redução na atividade física, além de considerar-se ainda a predisposição genética para o excesso de peso (29).

1.2. IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DIFERENCIADO EM NÓDULOS DE TIREÓIDE

À medida que os métodos de imagem ficam mais sensíveis e se tornam mais acessíveis e à medida que a população envelhece, o diagnóstico de nódulos na tireóide cresce. A identificação correta dos nódulos que merecem investigação laboratorial completa e/ou cirurgia é fundamental para o estabelecimento de estratégias que representem a melhor relação de custo-benefício não apenas para o paciente, mas também para o sistema de saúde do nosso país, onde a alocação de recursos deve ser muito criteriosa. Para tanto, lançamos mãos de critérios epidemiológicos e clínicos de malignidade, conforme delineado abaixo. No entanto, o julgamento clínico deve prevalecer para evitar investigações desnecessárias. Apesar dos nódulos serem muito frequentes, o CDT é relativamente raro e sua evolução geralmente lenta, de forma que a observação clínica pode ser uma opção clínica adequada para nódulos pequenos em indivíduos sem fatores de risco atendidos em centros de atenção primária à saúde.

1.2.1. Avaliação Laboratorial Do Nódulo de Tireóide

Nódulos tireoidianos também aparecem como a principal manifestação clínica de uma série de doenças tireoidianas, incluindo doenças autoimunes e o nódulo autônomo tóxico. Por isso, a investigação do nódulo deve sempre incluir a função tireoidiana, pois a avaliação clínica nem sempre é sensível ou específica para detectar uma disfunção tireoidiana, principalmente no idoso.

A dosagem de TSH (hormônio estimulante da tiróide) é o método mais sensível para determinar o estado tireoidiano. Se o TSH sérico estiver baixo, deve-se solicitar a dosagem de T4 e T3 livres para caracterizar a presença e o grau do hipertireoidismo, lembrando que diversas situações ou drogas que podem levar a supressão dos níveis de TSH devem ser descartadas. Dosagem de anticorpos anti-tiroglobulina (acTg) e anti-tireoperoxidase (acTPO) podem ser úteis, pois títulos elevados sugerem tireoidite crônica de Hashimoto, doença auto-imune que não raramente se apresenta com poucas manifestações clínicas e, eventualmente, pode produzir com nódulos palpáveis na glândula tiróide. Por outro lado, a tireoidite pode coexistir com neoplasias além de aumentar o risco para aparecimento de um raro tumor, o linfoma da tiróide (30-31), não descartando, portanto, a obtenção de citologia por punção aspirativa para diagnóstico de malignidade. Já a evidência clínica e/ou confirmação laboratorial de hipertireoidismo diminui bastante a possibilidade de malignidade concomitante. Por outro lado, a dosagem de tiroglobulina (Tg) não tem sentido no diagnóstico de malignidade por não distinguir nódulos benignos de malignos.

1.3 MARCADORES TUMORAIS

Knudson (32) propôs uma teoria que permite classificar os indivíduos e as populações quanto às participações dos fatores ambientais e genéticos no desenvolvimento do câncer, e diz que há as mutações que conferem alto risco individual de um tipo particular de câncer em algum estágio da vida, independente do ambiente. Os indivíduos desta população são ditos predispostos e constituem minoria. Por outro lado, existe um

grupo maior de pessoas que têm menores chances para o desenvolvimento de neoplasias, mas seus riscos ainda são mais elevados que os da população geral, pois respondem à exposição ambiental. Assim, a precisa identificação de marcadores de suscetibilidade é de fundamental importância na predição de riscos (33). Por isso, faz-se necessário o uso de biomarcadores como “indicadores sinalizando eventos em amostras ou sistemas biológicos” (34-35).

A organização Mundial da Saúde (36) definiu três tipos de marcadores disponíveis para os estudos em sistemas biológicos:

1. Marcadores de Exposição, que fornecem informações sobre a quantidade de xenobióticos (compostos ausentes em sistemas vivos) a que os indivíduos estão expostos (presença na urina, plasma, saliva);
2. Marcadores de Efeito, que indicam a presença da doença ou de sinais pré-clínicos da mesma, representando momentos isolados do processo que podem ser qualitativa ou quantitativamente avaliados (trocas entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas, estados hormonais alterados, antígenos tumorais e mutações em oncogenes e genes supressores de tumor);
3. Marcadores de Suscetibilidade, que indicam indivíduos ou populações com diferenças biológicas capazes de afetar a resposta do organismo a agentes ambientais (absorção diferencial de micronutrientes e os polimorfismos nos genes de reparo e do biometabolismo).

Os Marcadores de Efeito são também chamados marcadores tumorais e são utilizados rotineiramente para acompanhamento e, em alguns casos, para diagnóstico de algumas neoplasias por darem indícios de sinais pré-clínicos da doença. Muitos marcadores tumorais já foram identificados, como a alfa fetoproteína (AFP), antígeno carcino

embriogênico (CEA), CA19-9, CA125 e antígeno específico da próstata (PSA) e têm sido usados como importantes ferramentas no controle e diagnóstico de diversos tipos de câncer.

Os cânceres em estágio inicial são difíceis de diagnosticar através de exames de imagem (como tomografia e ultrasonografia) devido a falta de sintomas clínicos e, portanto, métodos mais sensíveis para detectar esses tipos de câncer poderiam ser de grande valia para o estabelecimento de diferentes estratégias terapêuticas, bem como poderiam aumentar as taxas de cura (37). No caso de cânceres em estágios mais avançados, a junção de exames clínicos e dosagens de marcadores tumorais melhorou o diagnóstico e seguimento, porém, quando se trata de cânceres em estágios iniciais, ainda não há técnicas sensíveis o bastante que aumentem a chance de diagnóstico precoce.

No câncer da tiróide, o marcador mais utilizado em todo o mundo, base de todos os consensos sobre o tratamento do CDT, inclusive no Brasil, tem sido a tiroglobulina circulante (Tg), que, sendo secretada exclusivamente por células foliculares, indica a presença de remanescentes e/ou de novas células tiroidianas, permitindo o seguimento e determinando o prognóstico dos portadores de CDT (38). No entanto a Tg apresenta alguns problemas práticos no seguimento dos pacientes com CDT, particularmente quando existem anticorpos anti-Tg circulantes (39), o que ocorre em cerca de 20% dos pacientes. Embora novos ensaios talvez venham a suplantar este problema em um futuro próximo, na prática atual estes pacientes ainda não podem ser seguidos pelos valores de Tg (38, 40). Outro aspecto importante é que a Tg não serve para rastrear câncer entre os portadores de nódulos da tiróide (41).

Vários outros marcadores séricos vem sendo investigados nos últimos anos, como a TPO, a presença da translocação RET/PTC em células tumorais circulantes, a expressão de Galectina-3 e a citoqueratina 19.

1.4 GENE BRAF

O Gene BRAF faz parte da família das *RAF quinases*. Três isoformas foram descritas em células de mamíferos: *A-RAF* (do inglês v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog), *B-RAF* e *C-RAF* (do inglês proto-oncogene serine/threonine protein kinase) ou RAF-1 (do inglês v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1), sendo *BRAF* a isoforma mais expressa em tecidos hematopoéticos, testículos e células neuronais, bem como a forma mais prevalente nas células tireoidianas foliculares (42). Esta família de proto-oncogenes codifica sinais de tradução que primeiramente foram identificados em sua forma ativada, como oncogenes propriamente ditos (43).

O potencial oncogênico de *BRAF* foi descoberto durante estudo com cultura de células para o sarcoma de Ewing por Rapp em 1983 (44). Notou-se então que, em clones de cDNA (Acido Desoxirribonucléico complementar) que foram isolados, uma substituição na porção amino-terminal da proteína *RAF*, quando ativada por uma troca tiamina – adenina no nucleotideo 1796 original, gerava uma troca de aminoácido valina por ácido glutâmico, o que conferia atividade mutagênica a um gene que era estruturalmente relacionado porém distinto de *C-RAF* e *A-RAF* já previamente conhecidos, sendo assim chamado *BRAF*. Esta isoforma exhibe a estrutura bilobar característica do grupo das proteíno-quinases que, em sua conformação inativa, formam resíduos hidrofóbicos nos domínios 596 a 600 no sítio de ligação com ATP (Trifosfato de adenosina), resultando numa estrutura não propensa à interação com este ou outros substratos (43). Mutações oncogênicas nesta alça de ativação ou no sítio de ligação com o ATP rompem esta interação hidrofóbica e desestabilizam a conformação inativa. A troca de uma timidina por uma adenina na posição 1799 deste

proto-oncogene (*T1799A*) é a mutação de ponto mais conhecida com efeito desestabilizador em *BRAF* (44)).

A demonstração de mutações ativadoras para este gene foi otimizada com o desenvolvimento de ensaios para alterações genéticas sabidamente ativadoras da via *MAPK* (do inglês Mitogen-activated protein kinases), o que acabou reiterando a importância da mesma na gênese de vários cânceres em humanos (45). Este gene possui ainda sete polimorfismos pontuais de nucleotídeo que são denominados *SNPs* (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) descritos para regiões intrônicas ou promotoras, responsáveis por diferentes haplótipos que foram inicialmente relacionados ao risco de desenvolvimento de melanoma (46). As mutações do gene *BRAF* também vêm sendo correlacionadas com tipos histológicos mais agressivos de carcinoma diferenciado em tireóide, de forma que é possível que os haplótipos em questão também se correlacionem com o prognóstico dos pacientes (46)..

Das três isoformas, *BRAF*, localizada no braço longo do cromossomo 7, é a mais potente ativadora da via *MAPK* (47-48). Kimura e colaboradores identificaram no ano de 2003 uma mutação no códon 600 do exon 15 do gene *BRAF* onde uma valina é substituída por um ácido glutâmico como a ocorrência genética mais freqüente de tumores papilíferos da tireóide(49). Uma série de trabalhos subsequentes comprovou que a mutação de *BRAF* é o evento gênico mais freqüente nos carcinomas papilíferos, chegando a ocorrer em 69% dos casos (50). Esta mutação, anteriormente chamada *T1796A*, era baseada na seqüência NM 004333 da base de dados do National Cancer Institute (NCI) denominada *Gen Bank*, a qual carecia de um códon do exon 1 do gene *BRAF*. Com a correção da versão e a vigência da seqüência NT 007914 já disponível, a mutação passou a ser designada *T1799A* e é atualmente designada como *V600E* e não mais *V599E* (51).

O gene *BRAF* está implicado na ativação da via da cascata RAS-RAF-MAP quinases (MAPK) (Figura 3). É uma via reguladora do ciclo celular, fundamental para a síntese de DNA, diferenciação celular e estabilidade cromossômica (52). A mutação *V600E* mimetiza a fosforilação do seguimento de ativação de *BRAF* pela inserção de um resíduo de carga elétrica negativa adjacente ao sítio de fosforilação (45). Isto leva à conversão de *BRAF* a uma forma cataliticamente ativa, que ativa a via das MAPK.

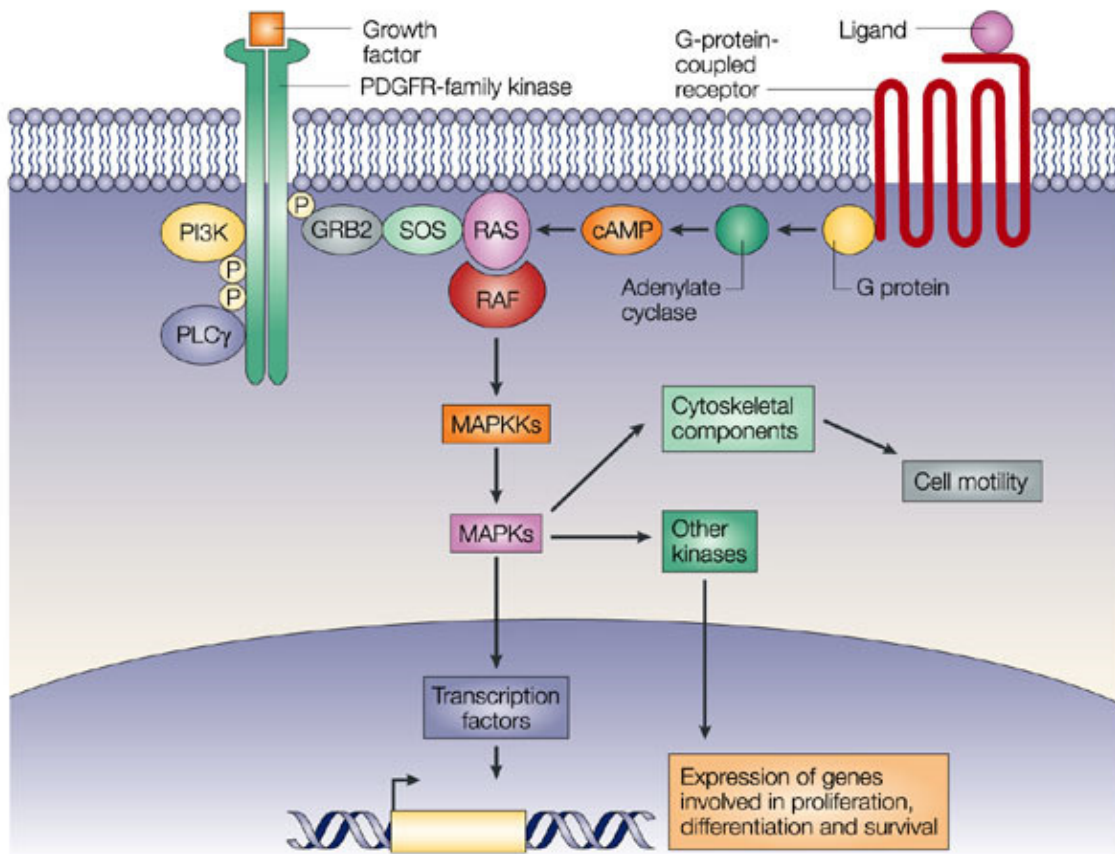


FIGURA 3. Cascata RAS-RAF-MAPK, da qual participa o gene *BRAF* que, quando mutado, ativa ainda mais esta via. Retirado de Dibb *et al* (53)

Vários estudos têm mostrado que a mutação de BRAF se associa com tumores com invasão extra-tiroidiana, estádios clínicos mais avançados e fenótipos mais agressivos (54-56). Nosso grupo tem resultados preliminares que sugerem que, além dos critérios clínicos, ultrasonográficos e histológicos classicamente utilizados na determinação de agressividade tumoral, a quantificação da expressão do gene BRAF pode ser importante no sentido de se estratificar indivíduos de risco para pior evolução. Assim, verificar este gene em circulação sanguínea poderia ser uma alternativa viável para complementação diagnóstica de lesões “inconclusivas” à citologia de material obtido por punção aspirativa.

1.5 TIROPEROXIDASE (TPO)

A biossíntese dos hormônios tireoidianos depende do funcionamento normal de uma série de proteínas que são necessárias tanto para a captação de iodeto através da membrana basolateral dos tireócitos como para sua incorporação à proteína acceptora, a tireoglobulina (Tg), o que ocorre na superfície apical da célula folicular (57).

Simplificadamente, a síntese de hormônios tireoidianos se inicia com a captação do iodeto, através do co-transportador sódio-iodeto (NIS). Esse iodeto é transportado do pólo apical dos tireócitos pela pendrina, através da membrana celular e é incorporado à tireoglobulina. Sofre, então, oxidação e organificação, reações catalisadas pela TPO em presença de peróxido de hidrogênio.

A oxidação do iodeto e sua organificação parecem ocorrer principalmente na superfície apical da célula folicular, e estas reações são catalisadas pela tireoperoxidase na presença de peróxido de hidrogênio(57). Assim, a organificação tireoideana do iodo

depende da atividade TPO, a qual é modulada pelas concentrações de substrato (tireoglobulina e iodeto) e cofator (peróxido de hidrogênio)(57).

A TPO é uma hemoglicoproteína com 933 aminoácidos e peso molecular de 103 quilodaltons (kDa), que se encontra na membrana plasmática apical da célula folicular com o seu domínio catalítico voltado para o colóide (58). A proteína está distribuída em diferentes localizações subcelulares, como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e vesículas próximas à membrana apical da célula folicular, na interface citoplasma-colóide (58-62).

O gene da TPO humana, localiza-se no braço curto do cromossoma 2, está clonado e a seqüência completa possui 3048 nucleotídeos (63). A enzima é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso da célula folicular é transferida para a membrana apical através de complexo de Golgi e vesículas exocíticas (62). A expressão da TPO é controlada pelo TSH através de um sistema dependente de 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPC)/proteína cinase A (PKA) (64).

Acredita-se que a TPO seja responsável pela catálise de 3 reações da biossíntese hormonal: a oxidação de íons I⁻, a iodação da tireoglobulina e o acoplamento de iodotirosinas, formando iodotironinas (60-61). Foi proposta a existência de dois sítios catalíticos na TPO, um para ligar-se ao I e outro para ligar-se à tirosina, aminoácido presente na tireoglobulina. Esses dois substratos irão sofrer oxidação pela TPO, produzindo radicais livres a partir do iodeto e da tirosila, que se ligam formando moniodotirosina (MIT). A MIT, ainda ligada à TPO, pode sofrer nova oxidação e reagir com outro radical do iodeto, produzindo diiodotirosina (DIT). As iodotirosinas formadas são acopladas, formando os hormônios tireóideos tetraiodotironina (T4) ou 3,5,3'-triiiodotironina (T3) (Figura 4).

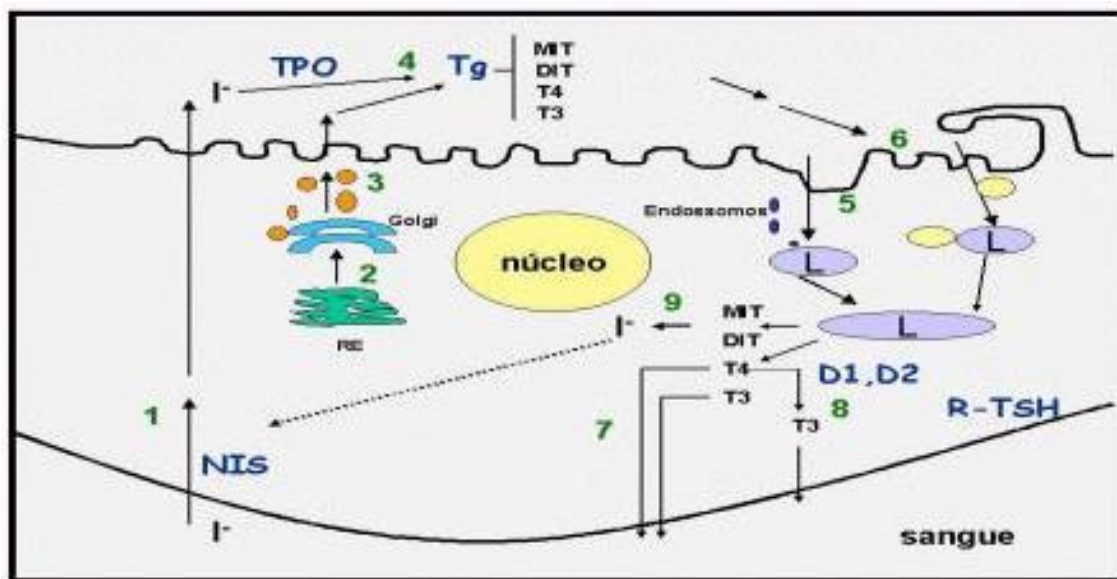


FIGURA 4. Via de produção dos hormônios tireoidianos, com a participação da proteína TPO. Retirado de Dora *et al.* (65)

Em 2006, a expressão de TPO em sangue periférico foi relacionada ao CPT, abrindo uma possibilidade de ser usada como marcador tumoral para diagnóstico precoce (37). Roddiger *et al.* (66) detectaram RNAm de TPO em sangue periférico de pacientes com doenças malignas e benignas da tireóide; entretanto, não houve diferença significativa nas taxas de detecção os pacientes com doenças benignas e malignas. Ishikawa *et al.* (37), desenvolveram um método para quantificar os níveis de RNAm de TPO em sangue periférico, utilizando a técnica de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa). Neste trabalho, foram encontradas diferenças na expressão de TPO em indivíduos saudáveis e em pacientes com doenças benignas e malignas (especialmente CPT) da tireóide, o que pode indicar que este método poderia detectar cânceres em estágios iniciais, constituindo um bom marcador tumoral para o câncer de tireóide.

1.6 GALECTINA-3

A Galectina-3 (GAL-3) pertence a família das galectinas, que são proteínas pertencentes a família das lectinas animais que apresentam duas características principais: afinidade por oligossacarídeos contendo β -galactose e alto grau de similaridade no domínio de reconhecimento de carboidratos. Até o momento 14 tipos de galectinas já foram descritas, sendo a mais estudada a Galectina-3.

A família das galectinas apresenta 14 membros identificados em mamíferos, todos contendo o domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) de aproximadamente 130 aminoácidos. Baseados no número e organização deste domínio, os membros desta família foram classificados dentro de 3 subtipos: O grupo protótipo (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 e -14) que apresenta um único DRC, o grupo *tanden repeat* (galectina-4, -6, -8, -9 e 12) que apresentam dois DRC e o grupo quimera que apresenta um DRC conectado a um incomum domínio N-terminal longo que é rico em aminoácidos glicina e prolina (67-68). A galectina-3 é único membro do grupo quimera que foi identificado em vertebrados (67-68).

As galectinas estão ligadas a diversos processos vitais para a célula e também estão relacionadas à iniciação e progressão tumoral através de: regulação da adesão celular e crescimento; interação com proteínas relevantes ao crescimento como os protooncogenes H-Ras (do inglês v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) ou Bcl-2 (do inglês B-cell CLL/lymphoma 2); superexpressão em tumores; e interações com reguladores do ciclo celular, como p53 (do inglês protein p53), que pode controlar a expressão de galectina (69).

A Galectina-3 é uma proteína monomérica com cerca de 30 a 35 kDa e é composta por 3 domínios estruturais distintos: amino terminal, sequência rica em glicina e domínio

carboxi terminal(70). Sua expressão se dá em células inflamatórias (macrófagos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos), fibroblastos, células dendríticas, neurônios e células epiteliais de variados órgãos. Essa proteína pode estar localizada tanto no meio intracelular (citoplasma e núcleo) quanto no meio extracelular (71), mas os mecanismos de saída não são conhecidos, e ela interage com diversas vias diferentes ligadas ao surgimento e progressão tumoral. (Figura 5).

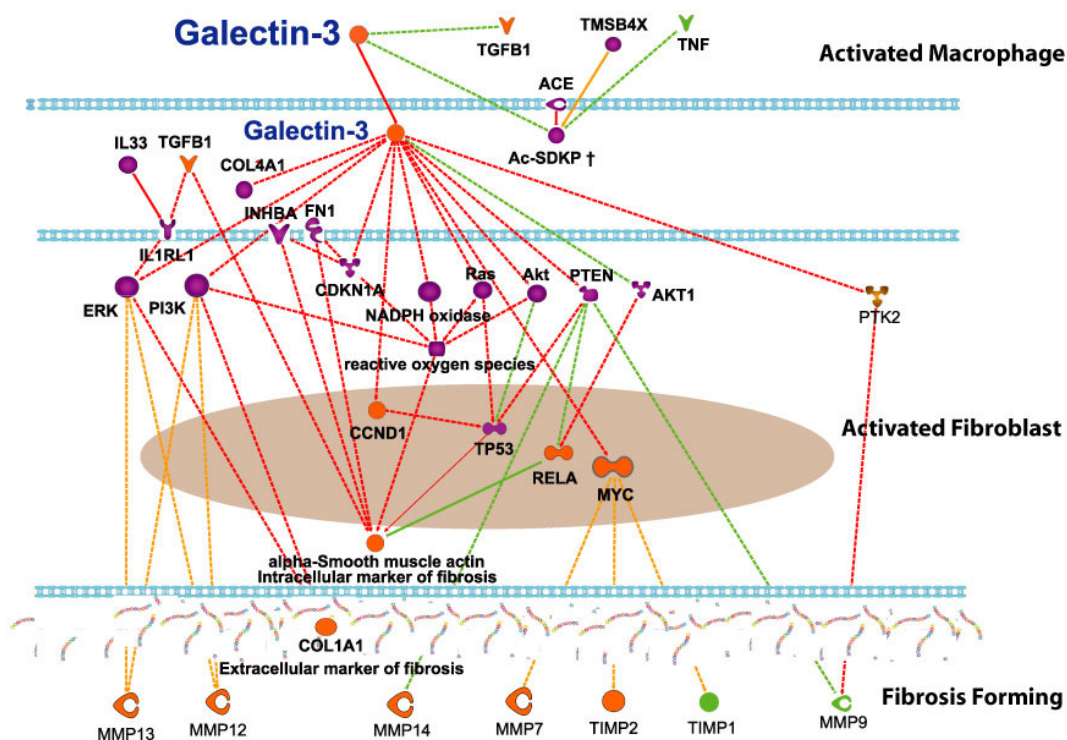


FIGURA5. Galectina-3 e suas diferentes vias de ligação, sendo que muitas destas levam a progressão tumoral. Retirado de Galectin-3 (72)

Quando localizada no meio extracelular, pode ser responsável pela adesão e de-adesão de células ou então por conformação diferencial pode promover ligação cruzada de glicoproteínas, o que levaria células a apoptose ou a proliferação celular desenfreada (73-

75). Se localizada no citoplasma, a galectina-3 pode estar envolvida no processo de apoptose e se localizada no núcleo, pode estar envolvida com a ativação de fatores de transcrição que também podem levar ao desequilíbrio do ciclo celular (76). A galectina-3 é encontrada em vários tecidos tanto em condições normais como patológicas (77-78). Embora a expressão de galectina-3 tenha sido observada em uma infinidade de tecidos normais, ela é principalmente descrita em tecidos de origem epitelial e em células do sistema imunológico (77) . A expressão de galectina-3 também é observada em uma grande variedade de carcinomas (78).

A identificação histológica de Gal-3 é útil no diagnóstico de malignidade tiroideana (69, 79), e consiste num bom marcador para tumores papilíferos (80). Saussez *et al* (69) em publicação recente quantificaram os níveis de GAL-1 (Galectina-1) e de Gal-3 sérica em pacientes com nódulos tiroideanos benignos e malignos em comparação a pacientes saudáveis e encontraram evidências de que os níveis de Gal-3 podem estar significativamente elevados em pacientes com CDT. Porém, Isic *et al* (81) não foram capazes de demonstrar nenhuma diferença significativa nos níveis de Galectina-3 sérica de pacientes com CDT, outros nódulos tiroideanos e indivíduos saudáveis.

1.7 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR - VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

Todos os tumores necessitam de suprimento nutritivo e de oxigênio para se manterem “vivos” e reproduzindo-se desenfreadamente. A partir do momento em que um pequeno tumor passa a formar uma massa sólida, há certo comprometimento de algumas

regiões desse tumor no recebimento desses nutrientes/oxigênio. Para suprir essa carência, seriam necessários vasos sanguíneos que fizessem o aporte das necessidades. Apesar de haver um número muito grande de tipos de câncer, os mecanismos pelos quais as células tumorais crescem e sobrevivem são similares. A angiogênese é considerada um desses mecanismos. Um responsável pelo surgimento de vasos sanguíneos em tumores é o Fator de Crescimento Endotelial Vascular, ou VEGF (82). Quando as células apresentam hipóxia (em geral as células mais centrais do tumor em crescimento apresentarão, pois os nutrientes e oxigênio não conseguem chegar até elas), elas liberam HIF (do inglês *hipoxiainducible factor*), um fator de transcrição intracelular. O HIF, entre outras atividades, estimula a produção e a liberação extracelular de uma família de fatores chamada VEGF.

A família VEGF consiste em várias glicoproteínas secretadas por leucócitos, células endoteliais, células neoplásicas e células do estroma tumoral, responsáveis pela regulação de diferentes funções nas células endoteliais, destacando-se: o crescimento, a proliferação, a migração e a diferenciação celular (82). Essas glicoproteínas também atuam no tônus vascular, na produção de moléculas vasoativas e no estímulo a quimiotaxia dos monócitos. Os VEGFs humanos são 5: VEGF-A (Fator de Crescimento Endotelial Vascular A) (ou VEGF) (responsável por Angiogênese, quimiotaxia para macrófagos e granulócitos e vasodilatação (pela liberação de NO)), VEGF-B (Fator de Crescimento Endotelial Vascular B) (Angiogênese embrionária), VEGF-C (Fator de Crescimento Endotelial Vascular C) (Linfangiogênese), VEGF-D (Fator de Crescimento Endotelial Vascular D) (Linfangiogênese ao redor dos bronquíolos pulmonares) e PLGF (do inglês Placental Growth Factor) (83) (Figura 6).

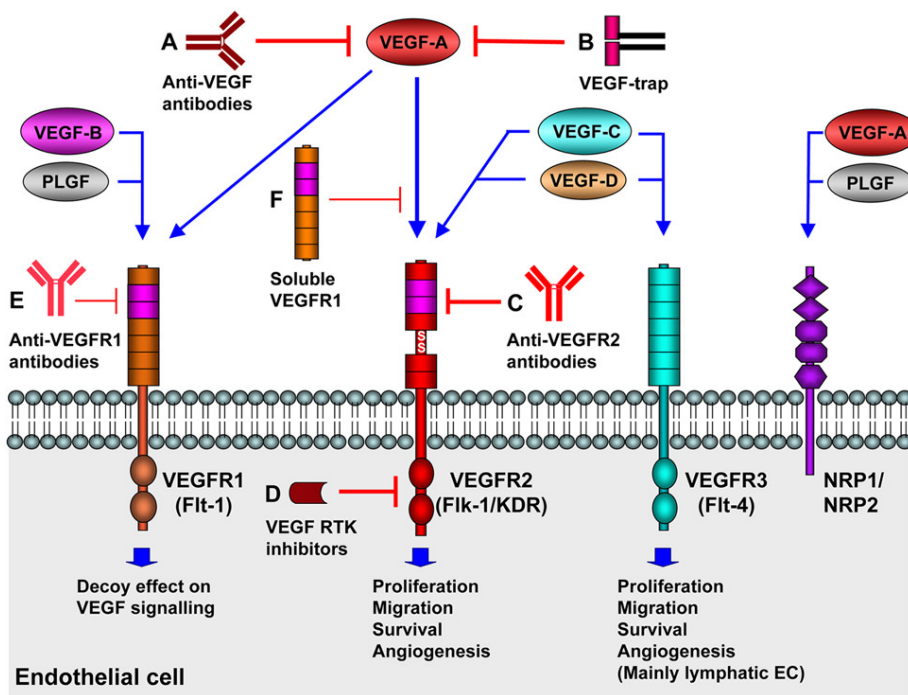


Figura 6. As cinco isoformas de VEGF e seus efeitos biológicos na proliferação, migração, sobrevivência e angiogênese. Retirado de LI *et al* (83)

O VEGF apresenta 5 isoformas, e estimula a migração e proliferação de células endoteliais de artérias, veias e microvasos. Promove, também, a degradação balanceada da matriz extracelular ao redor dos brotos endoteliais e aumenta a permeabilidade de vênulas às proteínas circulantes, incluindo fibrinogênio, o que facilita a deposição perivascular de fibrina, que irá potencializar a angiogênese (82). Também por induzir o óxido nítrico, pode medir a vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo que precedem a angiogênese, estando, dessas formas, envolvido na progressão tumoral/metastática (82).

Um dos mais potentes agentes angiogênicos conhecidos é o VEGF-A. Trata-se de uma glicoproteína dimérica com peso de 36-46 KDa que age promovendo angiogênese e aumento da permeabilidade vascular. Como o primeiro VEGF a ser descoberto foi o VEGF-A, na ocasião foi denominado apenas VEGF. Diante deste fato, designaremos o VEGF-A como VEGF apenas. VEGF é uma potente citocina responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e vem sendo o foco nas pesquisas da angiogênese de tumores, sendo essencial para o crescimento de tumores e, acredita-se de metástases. Tem se demonstrado que muitos tumores expressam o VEGF e que ele tem um papel crítico no desenvolvimento e manutenção de rede vascular de tumores que, por sua vez, promove crescimento e metástase tumoral .

Tem se demonstrado que muitos tumores expressam o VEGF, inclusive o CDT (84-85) e que ele tem um papel crítico no desenvolvimento e manutenção de rede vascular de tumores que, por sua vez, promove crescimento e metástase tumoral. Veselý *et al* (85) descreveram a quantificação de fatores de crescimento como VEGF em soro de pacientes portadores de CDT através de kits de ELISA (do inglês Enzyme-linked immunosorbent assay). Em trabalho recente, Yu *et al* (84) demonstraram que os pacientes portadores de Carcinoma Papilífero da tiróide possuíam níveis séricos da proteína VEGF mais elevados quando comparados a pacientes portadores de doenças benignas da tiróide. Neste mesmo estudo, a presença de níveis mais elevados de VEGF e VEGF-C foi relacionada com variáveis de pior prognóstico ao paciente, como metástases linfonodais e a distância, sugerindo que a proteína VEGF pode vir a ser utilizada como marcador de diagnóstico e também de prognóstico. Dessa forma, a expressão de VEGF pode se mostrar um bom marcador de prognóstico de pacientes portadores de CDT. Como os tumores tiroidianos

produzem metástases em vias linfáticas, elegemos também VEGF-C como alvo de estudo, pro estar ligado a linfangiogênese.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Obter marcadores de malignidade para os nódulos da tiróide.

2.2 Objetivos específicos

Estudar a aplicabilidade clínica da identificação de alguns marcadores de malignidade como:

1. A mutação de *BRAF* em células tiroidianas circulantes
2. A expressão de TPO em sangue periférico
3. Os níveis séricos de GAL-3
4. Os níveis séricos de VEGF
5. Os níveis séricos de VEGF-C
6. Comparar os dados obtidos com variáveis clínico-patológicas

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) /Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Laboratório de Investigação em Metabolismo e Diabetes (Limed) da UNICAMP, com a colaboração do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital da Clinicas (HC-UNICAMP), Hemocentro-UNICAMP e Hospital de Câncer de Barretos (HCB)

3.1. Casuística

A casuística alcançada neste estudo foi composta de: 165 pacientes com CDT (vindos da UNICAMP e do HCB), 31 pacientes com nódulos Benignos - Bócios (HCB) e 216 controles (UNICAMP). Dentro do grupo maligno, encontramos diferentes variantes, que estão detalhadas na tabela 1.

Tabela 1. Descritiva dos tipos histológicos dos casos malignos (CDT) incluídos no estudo.

| Tipos histológicos | N | Porcentagem (%) |
|------------------------------------|-----|-----------------|
| Câncer Papilífero (CP) | 139 | 84,25 |
| Microcarcinoma Papilífero (MCP) | 7 | 4,24 |
| Câncer Folicular (CF) | 19 | 11,51 |
| Total | 165 | 100 |

3.1.1 Pacientes com CDT

Obtivemos sangue periférico e dados clínicos e anatomopatológicos de 165 pacientes, provenientes do HCB e também do Serviço de Medicina Nuclear da UNICAMP, sob coordenação do Dr. André Lopes Carvalho e Dra Elba C. S. C. Etchebehere, respectivamente, colaboradores deste projeto. Estes indivíduos assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme determinado pelos Comitês de Ética da FCM/UNICAMP e do HCB, os quais aprovaram o presente projeto, com os números 705/2008 na UNICAMP e 233/2009 no HCB. Para seleção deste grupo, foram considerados fatores de inclusão:

- Para os casos recém diagnosticados: possuir nódulo tireoidiano que posteriormente deveria ter anatomopatológico de malignidade (este dado foi adquirido pós cirurgia, no prontuário)
- Para os casos vindos do Serviço de Medicina Nuclear: possuir histórico de nódulo tireoidiano com evidências de doença ativa à época da coleta (Tiroglobulina elevada acima de 2mg/ml, indicação de Radioiodoterapia (RIT)).

Desta forma, o sangue foi coletado: Para os pacientes recém diagnosticados à época da cirurgia, quando estes tinham indício de doença e possíveis células circulantes. Para os pacientes que estavam com doença recidivada, o sangue dos mesmos foi coletado em sua ida ao Serviço de Medicina Nuclear, quando iam receber a RIT.

Pacientes com histórico de outras malignidades foram excluídos deste estudo.

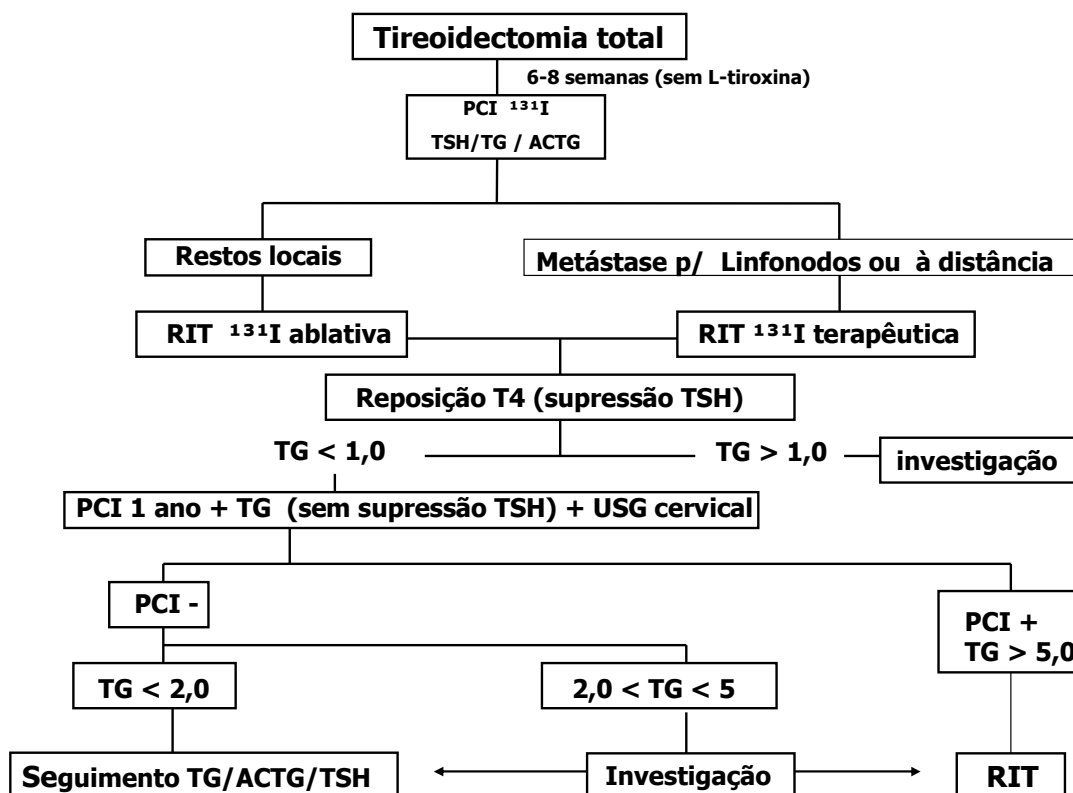
Todos estes pacientes seguem um protocolo padrão de conduta implantado no Ambulatório, e possuem prontuários nos quais constam, além de dados de identificação, idade ao diagnóstico, sexo, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos, dieta, tabagismo, uso de

medicamentos e drogas, exames realizados (ultra-som, pesquisa de corpo inteiro com iodo131, biópsia aspirativa), dados referentes à cirurgia e do exame anatomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação e presença de linfonodos metastáticos).

3.1.1.1 Seguimento

Os pacientes com câncer foram acompanhados com pesquisa periódica de corpo inteiro com iodo131, TSH sérico e medidas de tiroglobulina (Tg) de acordo com o protocolo de seguimento delineado na figura 7.

Figura 7. Protocolo de seguimento dos pacientes no ambulatório de Câncer da Tireóide



Este protocolo também incluiu Raio-X, ultrassonografia, tomografia computadorizada e outros procedimentos para detectar metástase à distância. Pacientes com valores de tireoglobulina $>0,2\text{mg/dl}$ e/ou pesquisas de corpo inteiro suspeitas, foram submetidos a uma busca através de exames de imagens. Nós definimos os tumores como recorrentes e/ou apresentando metástases a longa distância de acordo com os parâmetros acima.

3.1.2 Pacientes com Nódulos Benignos

Obtivemos sangue periférico e dados clínicos e anatomopatológicos de 31 pacientes, provenientes do HCB, sob coordenação do Dr. André Lopes Carvalho. Os indivíduos assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme determinado pelo Comitê de Ética do HCB, que aprovou o presente projeto com os números 705/2008 na UNICAMP e 233/2009 no HCB. Para selecionarmos os pacientes deste grupo, identificamos em seus prontuários a presença de tumores benignos da glândula tireóide comprovados através de exame citológico e/ou confirmados por exame histológico.

3.1.3 Indivíduos controle

Obtivemos sangue periférico de 217 voluntários que foram selecionados de forma a se parearem com os casos em sexo, idade e etnia, provenientes do Hemocentro da UNICAMP e do Laboratório Limed, sob coordenação do Dr. Marcelo Addas e Dr Bruno Geloneze, respectivamente, e parentes ou acompanhantes dos pacientes. Os indivíduos controle assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme determinado pelo Comitê de Ética da FCM/UNICAMP, o qual aprovou este projeto de número

705/2008. Nestes indivíduos foi aplicado um extenso questionário incluindo hábitos de vida, tabagismo, uso de medicamentos e/ou drogas, etilismo, histórico de doenças na família. Foram excluídos deste grupo pacientes que apresentassem hipo/hipertireoidismo ou histórico de nódulos tireoidianos na família.

3.2 Metodologia

3.2.1 Estudo do Gene BRAF

No Laboratório GEMOCA, as amostras foram armazenadas em geladeira, até a realização da extração de DNA (Acido Desoxirribonucléico) genômico (até três dias após coleta) de leucócitos periféricos através do método fenol-clorofórmio adaptado pelo nosso grupo e já bem estabelecido em nosso laboratório. Após uma semana, o DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, para verificar sua concentração.

Como tivemos problemas na identificação da mutação no DNA genômico, também extraímos o RNA dos leucócitos e o transformamos em cDNA para estudo da mutação por PCR-RFLP (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição).

O DNA/cDNA obtido foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene BRAF, na região da mutação V600E. O produto desta PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 2%, para a visualização do gel, que foi corado em brometo de etídio, e visualizado com auxílio da luz ultravioleta (UV).

Após a análise do gel, o produto da PCR foi submetido a uma restrição enzimática (RFLP). A visualização do produto da restrição se deu através de eletroforese com gel de poliacrilamida 6%, também corado com brometo de etídio, e visualizado com o auxílio da luz UV.

3.2.1.1 Extração de DNA de leucócitos

A extração de sangue periférico foi iniciada pela lise de hemácias, utilizando tampão de lise de hemácias e posterior lise de leucócitos com respectivo tampão de lise de leucócitos e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) seguindo-se incubação a 37⁰C durante 30 minutos. Seguiu-se a extração com protocolo de fenol-clorofórmio adaptado pelo nosso grupo há anos. Os produtos de extração obtidos pelos procedimentos de extração foram avaliados e quantificados com o auxílio de espectrofotometria.

3.2.1.2 Extração de RNA de sangue periférico

Foi feita extração de RNA (Ácido Ribonucléico) total das culturas de hepatócitos isolados, segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Para a produção do cDNA, utilizamos o kit RevertAidTM Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 100ng/μL.

3.2.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene BRAF

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se os reagentes detalhados na tabela 2 e as seguintes seqüências de *primers*:

sense 5'- GCTTGCTCTGATTGAGGGAAAA – 3'

antisense 5'- GATACTCAGCAGCATCTCAGG – 3'.

As condições da PCR foram: denaturação inicial a 94°C por dois minutos, seguidos por mais trinta e cinco de três passos: denaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento a 60°C por cinquenta segundos e extensão a 72°C por 40 segundos. Finalizados os trinta e cinco ciclos, há um período de extensão final de 10 minutos e então o termociclador entra na temperatura de 4°C eternamente, até que os produtos da PCR (que deverão ter 224 pb) sejam retirados da máquina e levados à geladeira até o momento em que serão submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 8) para checar se houve amplificação do fragmento desejado de DNA.

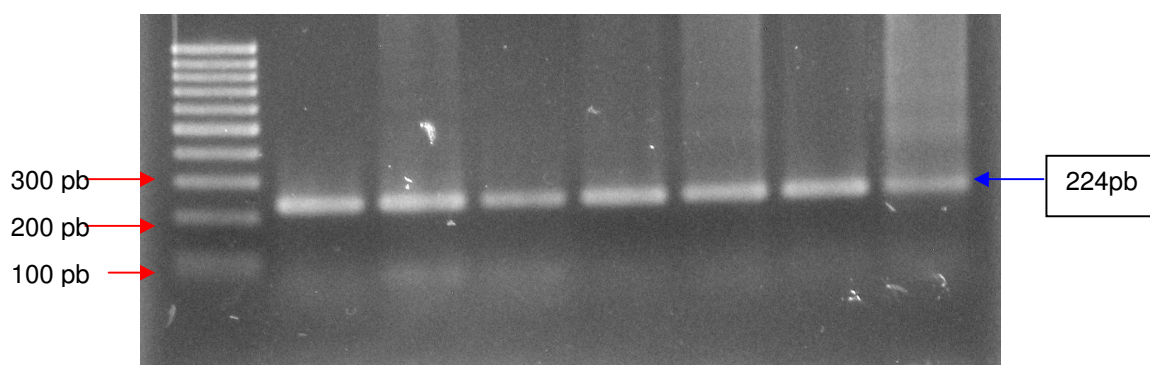


Figura 8. Gel de agarose 2% mostrando a amplificação da região de interesse do gene BRAF

Tabela 2. Reagentes usados na reação de PCR para BRAF

| Reagentes | Volume utilizado |
|------------------------|------------------|
| 10 X PCR Buffer | 5,0 μ L |
| Água miliq | 15,0 μ L |
| MgCl ₂ | 0,5 μ L |
| dAtp, dCtp, dGtp, dTtp | 1,0 μ L |
| Primer sense | 1,0 μ L |
| Primer anti sense | 1,0 μ L |
| Taq DNA Polymerase | 0,5 μ L |
| DNA genômico | 1,0 μ L |

3.2.1.4 Restrição Enzimática do Gene BRAF

Os produtos de PCR que foram amplificados foram submetidos à ação da enzima de restrição *TspRI* (New England Biolabs, INC). Esta enzima reconhece um sítio que está presente nos indivíduos de genótipo selvagem. Quando não há mutação, há clivagem do fragmento da PCR, resultando em 2 fragmentos visíveis, um de 124pb e outro de 87pb (Figura 5). Há, ainda, um terceiro fragmento que não é visualizado no gel devido a seu

tamanho muito pequeno (13pb). Os indivíduos portadores de mutação devem apresentar a banda sem clivagem (224pb) (Figura 9). A leitura dos resultados se fez após coloração do gel em brometo de etídio e submissão à iluminação ultravioleta para visualização.

Tabela 3. Reagentes usados na reação de Restrição Enzimática para BRAF

| Reagentes | Volume utilizado |
|----------------|------------------|
| NE Buffer | 1,0 μ L |
| BSA | 1,0 μ L |
| Enzima TspRI | 0,8 μ L |
| Produto da PCR | 10,0 μ L |

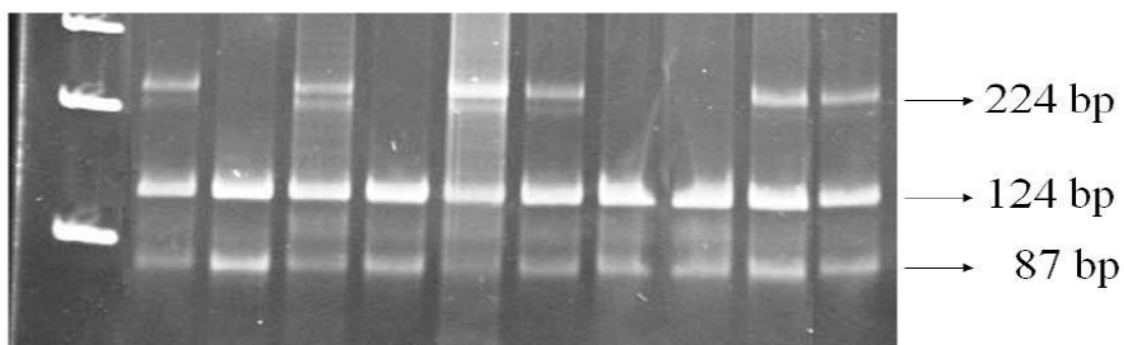


Figura 9. Gel de restrição do gene BRAF, evidenciando indivíduos de genótipo selvagem (bandas de 124pb e 87 pb) e indivíduos mutados (224pb)

3.2.2 PCR quantitativo (qPCR) (Real Time PCR) para análise da expressão do Gene TPO

3.2.2.1 Extração de RNA de sangue periférico

Foi feita extração de RNA total do aglomerado de leucócitos, segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Para a produção do cDNA, utilizamos o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

3.2.2.2 Reações de PCR quantitativa (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems), que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Para o gene TPO utilizamos respectivamente os seguintes assay (TaqMan™ - Applied Biosystems) Hs00892519_m1. Os genes *GAPDH* (*do inglês glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase*) e *β-actina* (TaqMan™ - Applied Biosystems), Hs03929097_g1 e Hs99999903_m1 respectivamente, foi escolhido como

controle endógeno da reação, os quais servem para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. As sondas *GAPDH* e *β-actina* estão marcadas com o fluoróforo FAM, assim como os *primers* para o alvo está marcado com o fluoróforo FAM.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo com os controles endógenos. As eficiências de amplificação dos genes devem estar próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse.

3.2.2.3- Validação da eficiência dos genes de interesse

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do um sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para a placa de validação do gene, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 2x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir

qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts dos controles endógenos e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual é possível verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (na concentração adequada indicada pela validação), sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µl de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A expressão gênica foi avaliada em células tratadas com ácidos graxos saturados, tratadas com ácido graxo insaturado, além dos controles negativos e dos veículos. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). No programa BioEstat 3.0 foram realizados os testes estatísticos *two-way* ANOVA com replicação (análise de variância) e Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença significativa na expressão do gene de interesse.

3.2.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Para o estudo das proteínas VEGF, VEGF-C, Galectina-3, Adiponectina e Leptina, utilizamos a técnica de ELISA, que se baseia na interação anticorpo-antígeno. Esta interação produz uma fluorescência na presença de um substrato, fazendo com que seja possível que a leitora capte a quantidade de coloração emitida e, assim, consiga “quantificar” a proteína desejada.

As dosagens das adipocinas estudadas foram realizadas no Laboratório Limed, sob coordenação do Prof Dr Bruno Geloneze, no Gastrocentro da UNICAMP. A concentração plasmática de Gal-3, VEGF e VEGF-C foram determinadas através do método ELISA colorimétrico, seguindo as especificações correspondentes aos Kits (Bender MedSystems para Gal-3 e R&D System para as demais). Todos os reagentes necessários para a realização das dosagens foram deixados em temperatura ambiente antes de usá-los.

3.2.3.1 Protocolo Geral ELISA

O protocolo geral ELISA foi muito similar ao utilizado para todas as proteínas:

Foi adicionado 100µL das amostras ou padrões no reagente diluente, ou diluente apropriado, por poço, cobrindo com filme e encubando por 2 horas em temperatura ambiente. Após essa etapa a placa foi aspirada e lavada novamente. No próximo passo foi adicionado 100µL de solução substrato em cada poço, encubando a placa por 20 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. Posteriormente, adicionou 50µL de solução stop

em cada poço e movimentou levemente a placa para garantir mixagem. Foi determinada a densidade óptica de cada poço imediatamente usando o leitor da microplaca.

3.2.4 Análise Estatística

Os dados foram tabulados em planilhas para análise descritiva em tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS. Para verificar associação ou comparar proporções foi usado o teste X² ou teste exato de Fisher, quando necessário. Para a 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 Spearman. Já para o estabelecimento de valores de corte dos testes comparativos, foi utilizada uma curva ROC (receiver operating characteristics), que mostrou os pontos de sensibilidade/especificidade. O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi de 5%.

4 - RESULTADOS

4.1 Gene BRAF

Para investigar a presença da mutação V600E de BRAF em células tiroidianas circulantes de CP, inicialmente extraímos DNA do sangue periférico de 100 pacientes. A mutação foi analisada através da técnica de PCR-RFLP. Os 100 pacientes apresentaram resultados de restrição condizentes com o padrão selvagem do gene BRAF (uma banda de 124 pb, uma de 87 pb e outra de 13 pb) no material obtido de sangue periférico.

Para confirmar a funcionalidade da enzima de restrição, testamo-la em 10 tumores, em busca de algum que tivesse a mutação, que é um evento relativamente comum no câncer de tiróide (cerca de 40% dos casos, segundo a literatura). Entre os dez tumores analisados, encontramos quatro mutantes heterozigotos (bandas de 211 pb, 124 pb, 87 pb e 13pb) para V600E, confirmando que a enzima de restrição estava em bom estado e funcionando.

Decidimos então, testar a identificação da mutação em cDNA resultante do RNA extraído de sangue periférico dos pacientes. Porém, de 100 casos que foram genotipados, não encontramos nenhum que fosse positivo para a mutação de BRAF

4.2 TPO

Não conseguimos encontrar expressão de TPO em sangue periférico. Não houve amplificação do ensaio em RNAm de sangue periférico. Embora tenhamos testado

diferentes concentrações e diferentes fatores de diluição, não foi possível validar a curva para TPO em sangue periférico.

Realizamos teste com o ensaio em tumores de tiróide onde obtivemos amplificação, como pode-se ver na Figuras 10 e 11, o que nos indicou que o ensaio realmente funcionava, embora não houvesse expressão do gene em sangue periférico.

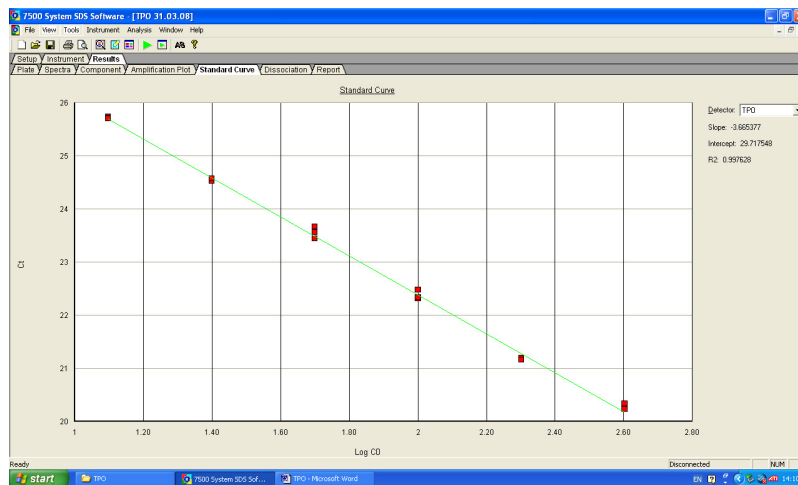


Figura 10. Curva padrão da quantificação absoluta de TPO.

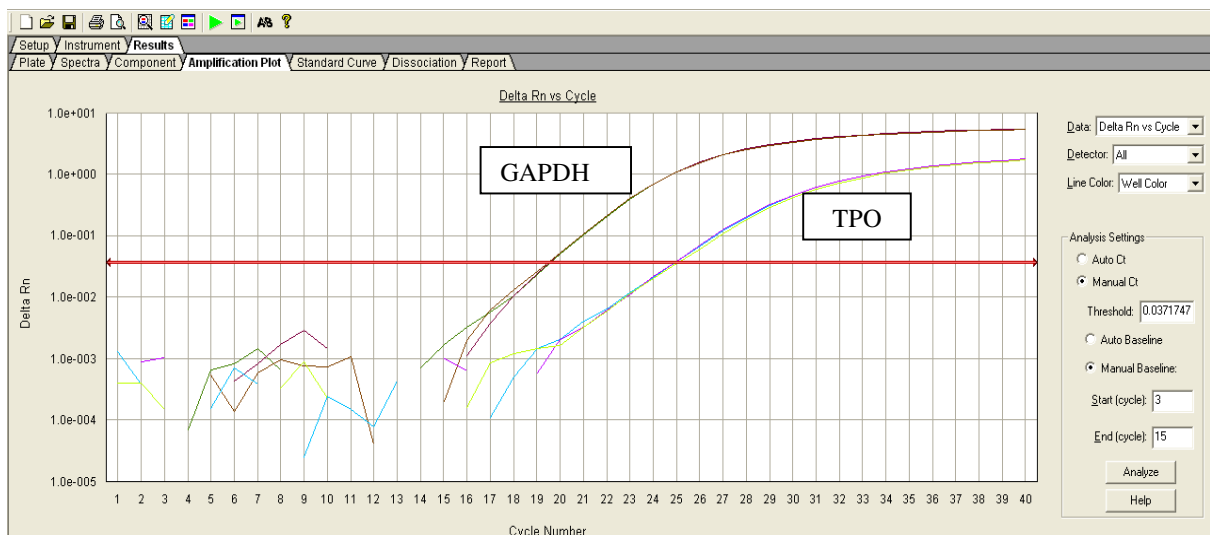


Figura 11. Curvas de amplificação do controle endógeno GAPDH e de TPO em tumores tiroidianos, indicando que houve amplificação de ambos os genes.

4.3 Galectina-3

Esta proteína foi dosada em 85 pacientes com CDT. Dentre eles, 69 eram CP, 5 eram MCP e 11 CF. Foram analisados, ainda, 14 pacientes portadores de Bócio com e sem hiperplasia nodular associada. Para comparação, foram analisados também 137 indivíduos controles saudáveis.

Pacientes com CDT apresentaram dosagens mais baixas de Galectina-3 (média: 1,77 ng/mL, mediana: 1,30 ng/mL) quando comparados a pacientes com nódulos benignos (média: 2,12 ng/mL, mediana: 1,38 ng/mL) e controles (média: 2,02 ng/mL, mediana: 1,71 ng/mL). A curva ROC (Figura 13) não apresentou nenhum ponto de alta especificidade e sensibilidade, sendo que para o valor de 1,29 ng/mL (melhor ponto na ROC) como ponto de corte (grupo câncer menor ou igual a 1,29 ng/mL e benignos maior que isso), encontramos uma sensibilidade de 50%, especificidade de 68%, Valor Preditivo Positivo de 89% e Valor Preditivo Negativo de 20%. Não encontramos correlação entre os níveis de expressão de Galectina-3 e idade ($p=0.317$), sexo ($p=0.471$) ou etnia ($p=0.8976$).

No entanto, os níveis de expressão de Galectina-3 diferiam nos indivíduos com CDT, nódulos benignos e controles (Kruskal-Wallis, $p=0.005$). Os níveis de expressão de Galectina-3 distinguia o grupo com CDT do grupo controle (Mann Whitney, $p=0.002$)., No entanto, não pudemos encontrar diferença entre as expressões protéicas dos grupos de nódulos benignos e controles (Mann-Whitney, $p=0.197$), assim como entre pacientes com CDT e com nódulos Benignos (Mann-Whitney, $p=0.884$) (Figura 12). A expressão de Gal-3 também não serviu para diferenciar CPs de CFs (Mann-Whitney, $p=0.7961$). Não

encontramos relação entre os níveis de tiroglobulina sérica acima ou abaixo de 2 IU/mL e as dosagens de Galectina-3 ($p=0.746$).

Dentro do grupo de malignos, houve correlação entre a dosagem de galectina e a presença/ausência de multifocalidade do tumor, já que os tumores multifocais tinham médias menores de galectina (1,59 ng/mL) que os não multifocais (1,84 ng/mL; Mann-Whitney, $p=0.035$). Quando dividimos os tumores em maiores que 2,0 cm ou menores/iguais a 2,0 cm, não houve diferença estatística entre os grupos (Mann-Whitney, $p=0.279$). Na comparação de Anticorpos Anti-Tiroglobulina positivos ou negativos, encontramos diferença entre os grupos sendo que os pacientes com anticorpos positivos possuíam menores médias (1,62 ng/mL) que os negativos (1,97 ng/mL; Mann-Whitney, $p=0.001$). Houve, ainda, diferença significativa entre as médias dos pacientes que estavam em Hipertiroidismo, Eutiroidismo e Hipotiroidismo (Kruskal-Wallis, $p=0.003$), sendo que não havia diferença entre as médias dos Hipertiródeos (1,93 ng/mL) em relação aos Eutiródeos (1,58 ng/mL) (Mann-Whitney, $p=0.132$), nem dos Hipotiródeos (1,19 ng/mL) em relação aos Eutiródeos (Mann-Whitney, $p=0.210$), mas houve diferença entre as dosagens nos Hipotiródeos quando comparados aos Hipertiródeos (Mann-Whitney, $p=0.001$).

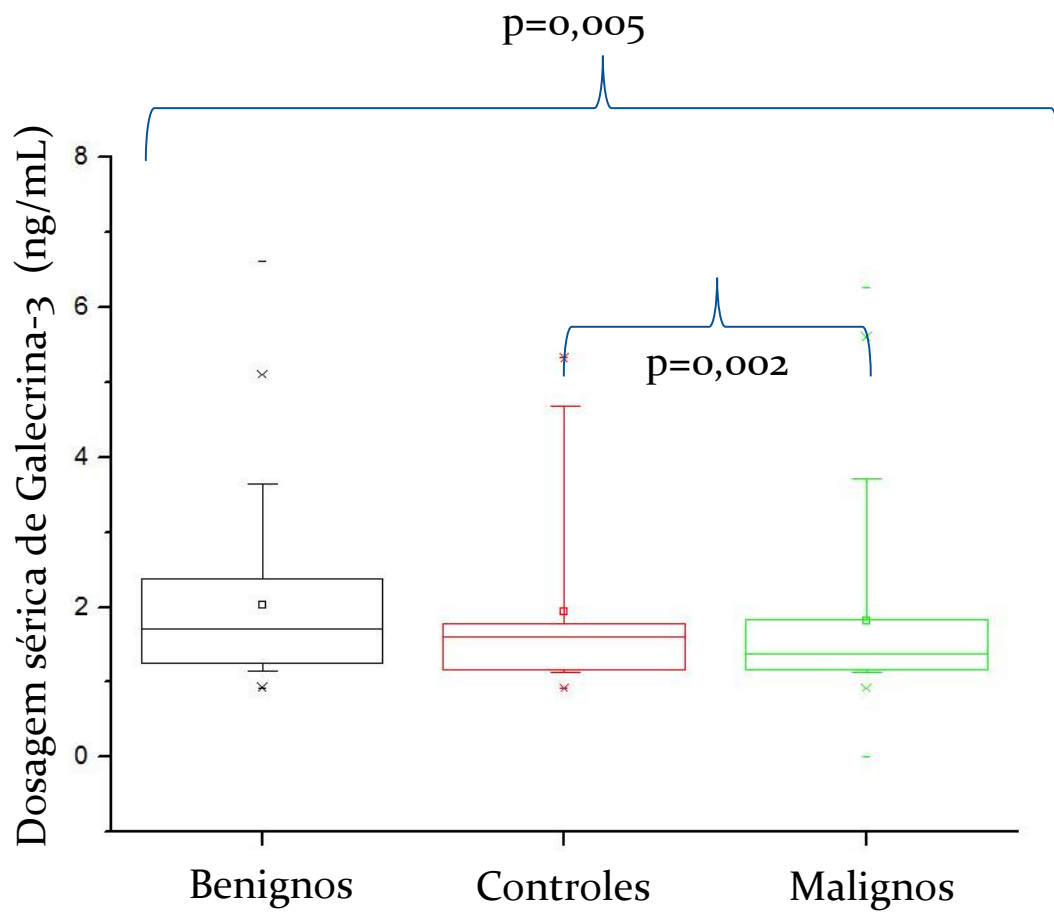


Figura 12. Box plot mostrando os valores de expressão de Galectina-3 em soro de Pacientes portadores de CP, CF, Nódulos Benignos e Indivíduos Controles.

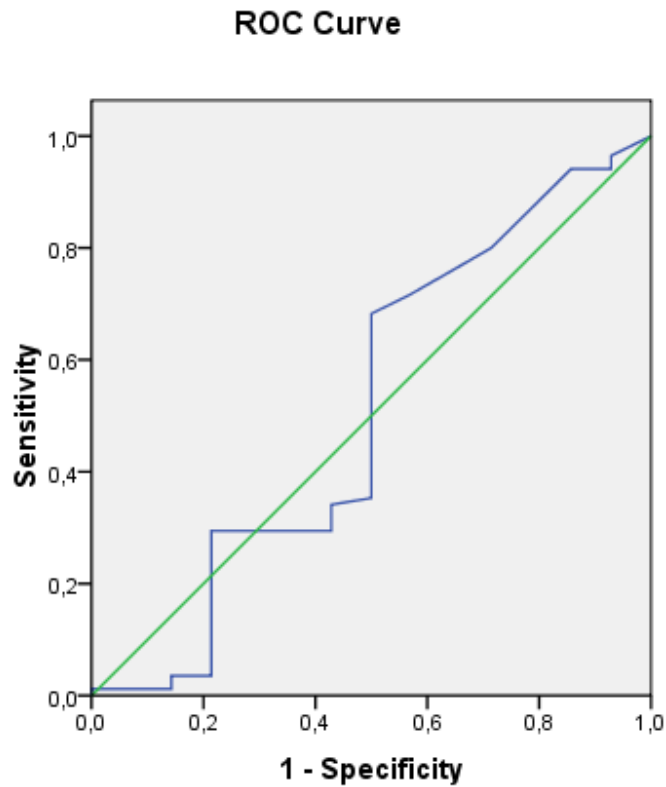


Figura 13. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da dosagem de Gal-3.

4.4 VEGF

Esta proteína foi dosada em 124 pacientes com CDT. Dentre eles, 105 possuíam CP, 7 MCP e 12 CF. Foram analisados, ainda 21 pacientes portadores de Bócio com e sem hiperplasia nodular associada. Para comparação foram analisados, também, 171 indivíduos controles saudáveis.

Os pacientes com CDT apresentaram níveis de VEGF sérica mais baixos (média: 231,55 pg/mL, mediana: 193,18 pg/mL) quando comparados a pacientes com nódulos benignos (média: 433,05 pg/mL, mediana 301,73 pg/mL) e controles (média: 309,87 pg/mL, mediana 227,93 pg/mL) (Figura 14). Para verificar a utilidade clínica desta expressão diferencial de VEGF na distinção de malignidade, utilizamos o teste de Mann-Whitney. A expressão de VEGF pôde diferenciar os pacientes com CDT de pacientes com nódulos benignos (Mann-Whitney, $p=0.041$), assim como pôde diferenciar os pacientes com CDT dos controles (Mann-Whitney, $p=0.015$). Quando fragmentamos o grupo de CDT em CP e CF, não foi possível diferenciar os nódulos malignos dos outros grupos (Kruskal-Wallis, $p=0.577$) e nem mesmo dentro do grupo maligno os CP dos CF (Mann-Whitney, $p=0.098$). A expressão de VEGF tampouco se mostrou útil na diferenciação de nódulos benignos quando comparada ados controles ($p=0.255$). Não houve relação entre os níveis de tiroglobulina sérica (acima/abaixo de 2 IU/mL) e as dosagens de VEGF (Mann-Whitney, $p=0.860$).

Dentro do grupo de malignos, não houve correlação das médias das dosagens com presença/ausência de multifocalidade do tumor (Mann-Whitney, $p=0.378$). Quando dividimos os tumores em maiores que 2,0 cm ou menores/iguais a 2,0 cm, não houve diferença estatística entre os grupos (Mann-Whitney, $p=0.813$). Na comparação de Anticorpos Anti-Tiroglobulina positivos ou negativos, encontramos diferença entre os grupos (Mann-Whitney, $p=0.042$), sendo que os pacientes com anticorpos positivos possuíam maiores médias (246,80 pg/mL) que os negativos (209,67 pg/mL). Não houve diferença significativa entre as médias dos pacientes que estavam em Hipertireoidismo, Eutiroidismo e Hipotireoidismo (Kruskal-Wallis, $p=0.214$).

A curva ROC (Figura 15) não apresentou nenhum ponto de alta especificidade e sensibilidade. Quando estabelecemos 193,18 pg/mL, que é o ponto mediano na ROC como ponto de corte, encontramos uma sensibilidade de 4,8% (0,048), Especificidade de 82,3 (0,832) , Valor Preditivo Positivo de 83% (0,836) e Valor Preditivo Negativo de 4,3% (0,043) para o diagnóstico de malignidade. Não encontramos correlação entre a dosagem de VEGF sérica e idade ($p=0.098$), sexo ($p=0.964$) ou etnia ($p=0.6511$).

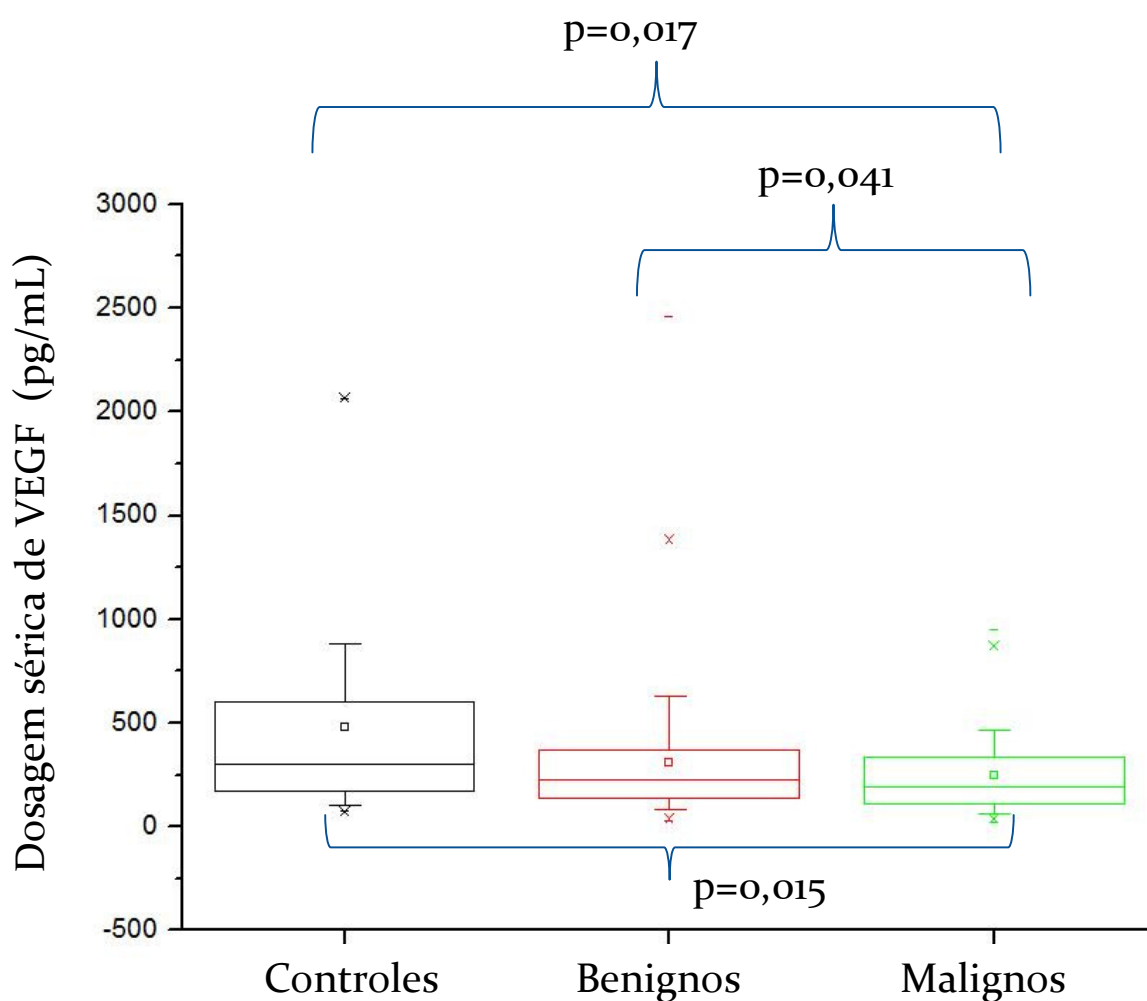


Figura 14. Box plot mostrando os valores de expressão de VEGF em soro de Pacientes portadores de CP, CF, Nódulos Benignos e Indivíduos Controles.

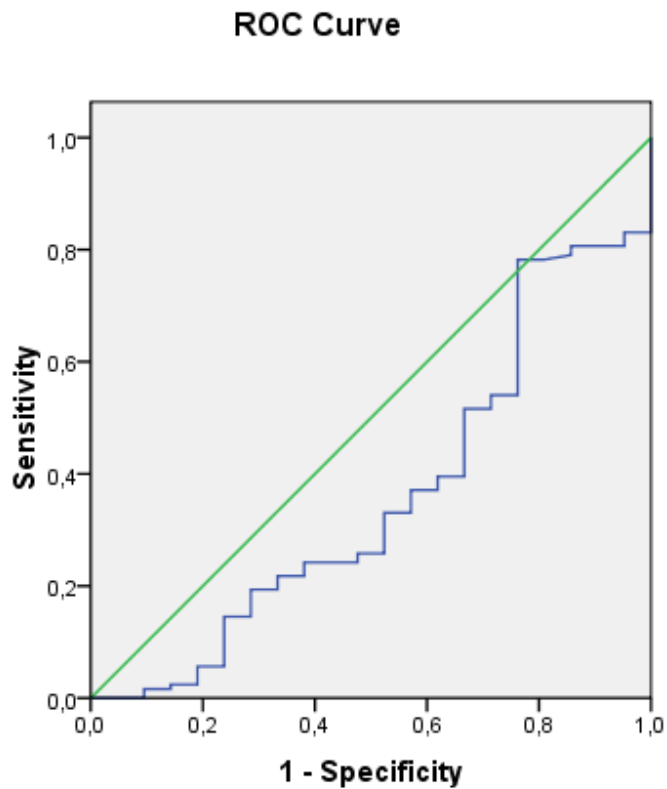


Figura 15. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da dosagem de VEGF.

4.5 VEGF-C

Esta proteína foi dosada em 99 pacientes com CDT. Dentre eles, 82 possuíam CP, 7 MCP e 6 CF. Foram analisados ainda 18 pacientes portadores de Bócio-hiperplasia e 153 indivíduos controles saudáveis.

Os pacientes com CDT apresentaram níveis de VEGF-C sérica mais baixos (média: 13,78 ng/mL, mediana: 9,71 ng/mL) do que os pacientes com nódulos benignos (média 24,62 ng/mL, mediana: 10,12 ng/mL), porém seus níveis eram mais elevados do que os dos indivíduos controles (média: 14,47 ng/mL, mediana: 7,44 ng/mL) (Figura 16). Assim, os níveis de VEGF-C distinguem pacientes com nódulos benignos, malignos e controles (Kruskal-Wallis, $p=0.025$). Os pacientes com CDT se distinguem dos controles (Mann-Whitney, $p=0,046$), porém não se distinguem dos nódulos benignos (Mann-Whitney, $p=0.242$). Por sua vez, os nódulos benignos diferem dos Controles (Mann-Whitney, $p=0.027$). Não encontramos diferenças dentro do grupo de malignos (Kruskal-Wallis, $p=0.060$). Não houve, ainda, correlação entre os níveis de VEGF-C sérica e idade ($p=0.412$), sexo ($p=0.535$) e etnia ($p=0.6554$). Também não houve relação entre os valores encontrados para VEGF-C e as dosagens de tiroglobulina sérica maiores/menores que 2 IU/mL ($p=0.304$)

Dentro do grupo de malignos, não houve correlação das médias das dosagens com presença/ausência de multifocalidade do tumor (Mann-Whitney, $p=0.868$). Mas, quando dividimos os tumores em maiores que 2,0 cm ou menores/iguais a 2,0 cm, houve diferença entre os grupos, sendo que os pacientes com tumores menores/iguais a 2,0 cm possuíam maiores médias de expressão de VEGF-C (16,49 ng/mL) quando comparados aos pacientes com tumores maiores (12,02 ng/mL; Mann-Whitney, $p=0.028$). Na comparação de Anticorpos Anti-Tiroglobulina positivos ou negativos, não encontramos diferença entre os grupos (Mann-Whitney, $p=0.352$). Não houve diferença significativa entre as médias dos pacientes que estavam em Hipertiroidismo, Eutiroidismo e Hipotiroidismo (Kruskal-Wallis, $p=0.061$).

A curva ROC (Figura 17) não apresentou nenhum ponto de alta especificidade e sensibilidade. Quando estabelecemos 7,2 ng/mL, que é o ponto mediano na ROC como

ponto de corte, encontramos uma sensibilidade de 11,1%, Especificidade de 89,9, Valor Preditivo Positivo de 84,8% e Valor Preditivo Negativo de 16,7% para o diagnóstico de malignidade. Não encontramos correlação entre a dosagem de VEGF-C sérica e idade ($p=0.087$), sexo ($p=0.154$) ou etnia ($p=0.897$).

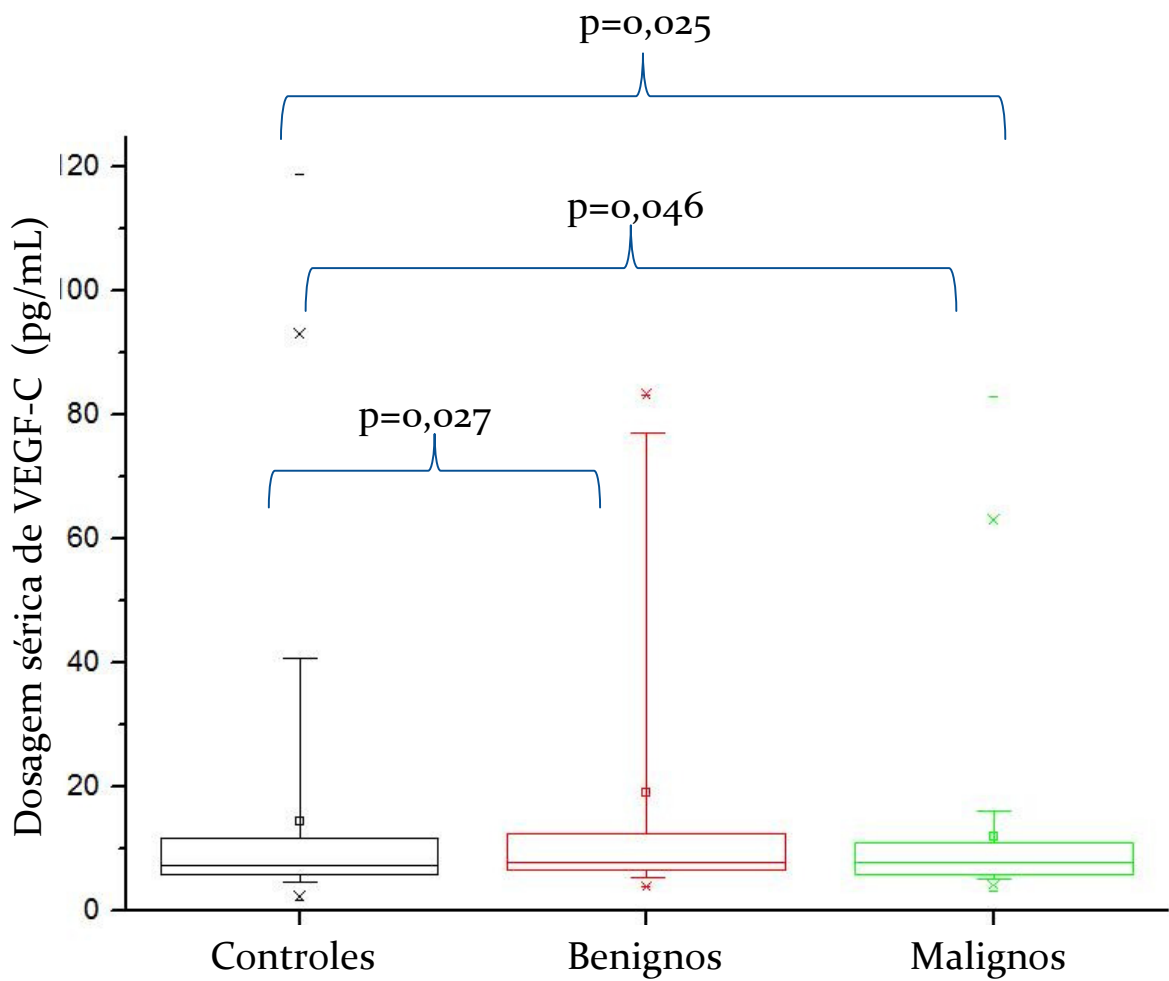


Figura 16. Box plot mostrando os valores de expressão de VGF-C em soro de Pacientes portadores de CP, CF, Nódulos Benignos e Indivíduos Controles.

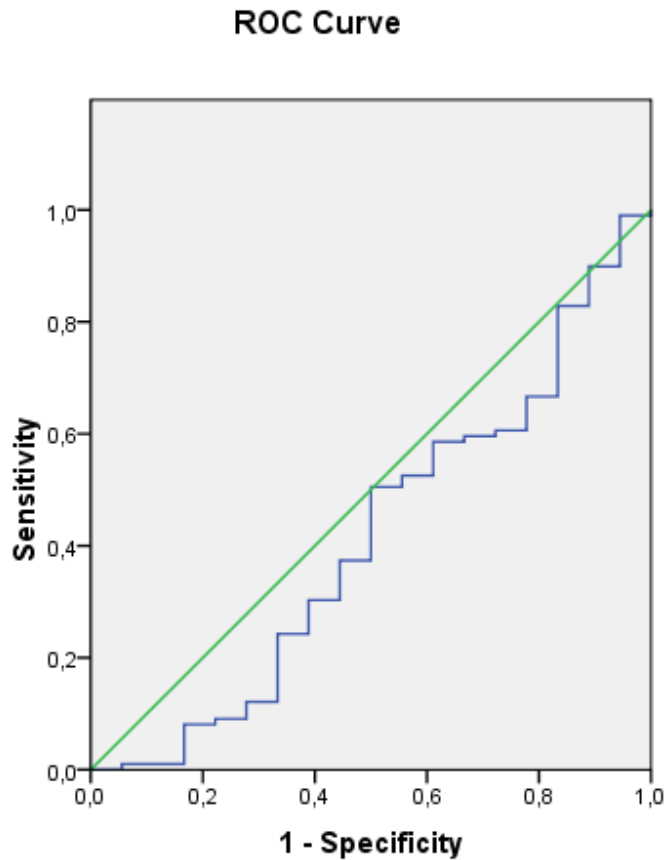


Figura 17. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da dosagem de VEGF-C.

4.6 Combinação de Gal-3, VEGF e VEGF-C

Quando analisamos as três proteínas: Gal-3, VEGF e VEGF-C em conjunto e traçamos destas uma curva ROC (Figura 18), encontramos que, estes marcadores, quando analisados em conjunto, apresentaram um Valor Preditivo Positivo razoável, de 89,5%, porém o Valor Preditivo Negativo foi baixo: 27,0%.

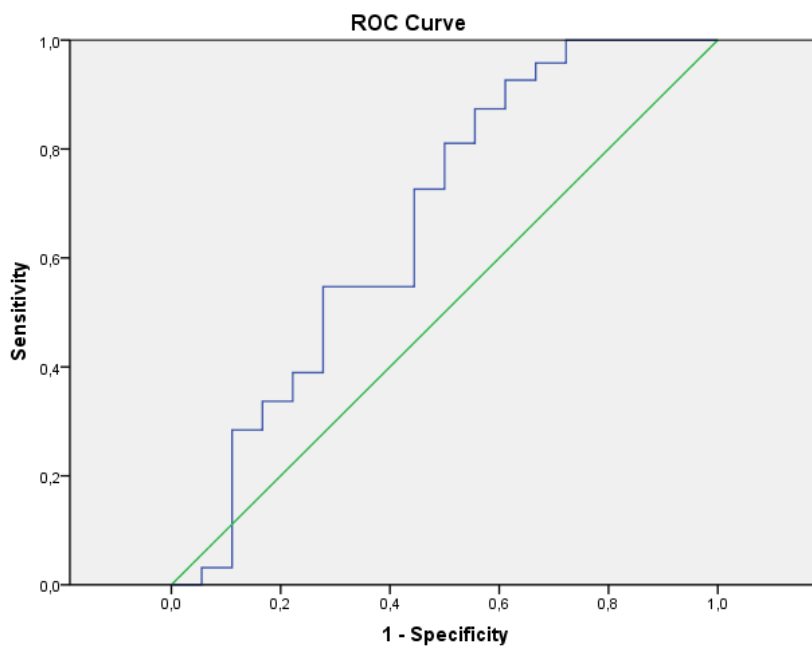


Figura 18. Curva ROC apresentando os pontos de especificidade e sensibilidade da análise dos três marcadores em conjunto.

5 - DISCUSSÃO

Identificar marcadores de malignidade em pacientes com nódulos de tiróide é essencial frente à grande prevalência desta condição na população. Embora os métodos atualmente empregados, baseados na descrição ultrasonográfica e na citologia sejam bastante eficazes, são métodos relativamente custosos e invasivos, não aplicáveis em nível de saúde pública. Assim, impõe-se a descoberta de novos métodos de rastreamento de malignidade, cuja realização seja fácil e prática. Marcadores séricos seriam ideais para esta situação.

A identificação da mutação de BRAF poderia ser interessante. Nosso grupo demonstrou que a maior expressão de BRAF em tumores pode ser fator indicador de pior prognóstico. Infelizmente, não foi possível identificar tal mutação em DNA extraído de leucócitos, pois todos os pacientes apareciam com o genótipo selvagem, ao contrário dos relatos da literatura que demonstram a mutação em cerca de 40% dos carcinomas papilíferos (86). Como a mutação é somática, optamos então, por analisar o cDNA do sangue periférico destes pacientes. Assim, estaríamos apenas analisando o RNA de células que estão expressando BRAF e, portanto, possuem maior chance de apresentar a mutação. Após análise de 100 pacientes, não encontramos nenhum caso com mutação. Tal fato pode ter ocorrido devido à sensibilidade pequena de nossa extração de RNA que pode não estar selecionando células tiroidianas em número suficiente para terem seu RNA extraído ou então pela técnica de PCR-RFLP que pode também não estar sensível suficientemente para identificar a mutação. Há referências em literatura de que a mutação V600E pode ser detectada em DNA extraído de sangue periférico (87-88). O estudo de Chuang (87) refere extração de DNA a partir do soro dos pacientes, técnica não utilizada neste estudo, e a detecção da mutação foi realizada de outra forma (Reação em Cadeia da Gap-Ligase), o

que pode ter influenciado na diferença de resultados. Já o estudo de Cradic (88), refere ter realizado extração a partir de Kit pronto, porém, novamente a análise da mutação foi feita de outra forma, tendo sido utilizada PCR alelo-específica. Esta técnica é mais próxima da utilizada por nosso grupo, porém, ainda diferente, o que pode ter influenciado em nosso insucesso na identificação das amostras. Embora a técnica utilizada tenha sido diferente, como nossa técnica parece ser funcionante em tecidos tumorais, acreditamos que não seja o método de PCR-RFLP, mas a separação e a quantidade de células tiroideas circulantes o fator limitante do nosso estudo.

Também não fomos capazes de encontrar expressão de TPO em RNAm de sangue periférico de pacientes com CDT, nem nos com nódulos benignos. Embora a literatura refira ter encontrado expressão deste gene em sangue periférico (37, 66), após o teste com dois diferentes ensaios certificados pela empresa comercializadora, não conseguimos demonstrar expressão deste gene em nossa população. Roddiger *et al* (66) relataram ter encontrado a expressão da TPO em sangue através da reação de RT-PCR. Já Ishikawa *et al* (37), em estudo de 2008 demonstraram ter encontrado um maior número de cópias em pacientes com maiores níveis de tiroglobulina sérica. Existe a possibilidade de que essa ausência de expressão possa ser causada, novamente, pelo número muito limitado de células que estão circulantes no CDT, o que teria feito com que a quantidade de material fosse muito pequena/inadequada para a análise.

Nossos dados sugerem que a dosagem de Galectina-3 sérica não é um bom teste diagnóstico para o CDT embora consiga diferenciar portadores de CDT de controles. Sua especificidade e sensibilidade, além do Valor Preditivo Positivo e o Valor Preditivo Negativo são baixos para distinguir malignidade entre os nódulos. Tampouco foi possível

correlacionar os níveis de Galectina-3 ao prognóstico dos pacientes, uma vez que estes não foram seguidos por tempo suficiente a partir do evento inicial para serem considerados livres de doença ou então recidivados. Nossos resultados estão em consonância parcial com o estudo de Saussez (69), que mostrava que os níveis de Galectina-3 poderiam ajudar a diferenciar CPs. Porém, diferentemente deste grupo, nossos resultados não demonstram uma diferenciação na expressão de nódulos benignos quando comparados a malignos, que seria o principal foco do diagnóstico diferencial, mas podemos diferenciar os CDT quando os comparamos a controles. Além disso, no estudo de Isic (81), os autores demonstraram que a expressão de Gal-3 era diferente em controles quando comparada a diversos tipos de nódulos. Nossos dados confirmam parcialmente esses resultados, demonstrando que entre controles e CDT temos diferenças de médias, porém, em relação aos outros grupos, a expressão de Gal-3 não foi capaz de diferenciar nódulos. Por outro lado, nossos resultados mostram correlação entre estado hormonal e os níveis de Gal-3 e encontramos, ainda, níveis de Gal-3 menores em pacientes com CDT multifocal do que nos unifocais, o que é inédito na literatura. Não há atualmente, descrição em literatura de interações entre características da tiróide Gal-3, o que sugere que são necessários mais estudos para o entendimento destas correlações.

Nossos dados sugerem que a expressão de VEGF pode diferenciar nódulos benignos de nódulos malignos, o que pode vir a ser útil como marcador de diagnóstico não invasivo de lesões tiroidianas. Não podemos, todavia, afirmar que este seria um bom exame diagnóstico, uma vez que a sensibilidade do ensaio é baixa. Estes dados corroboram os estudos de Yu (89) que mostraram que a expressão de VEGF pode ser um marcador de malignidade em tumores tiroidianos, sendo que suas médias de expressão podem discriminar indivíduos com CP de indivíduos com nódulos benignos. Nossos achados não

nos permitiram diferenciar grupos entre os tumores malignos (CP x CF). Porém, não possuímos tempo de seguimento suficiente para afirmar se os valores desta proteína podem, também, delinear o prognóstico do paciente com CDT. Embora tenhamos comparado os fatores clinico-patológicos com as dosagens de VEGF, não encontramos correlação desta proteína com estes dados, o que indica que VEGF pode não ser um bom marcador para evolução dos pacientes com nódulos de tiróide.

Em relação a proteína VEGF-C, embora haja descrição de que esta está diferencialmente expressa em pacientes com fenótipo mais agressivo da doença (90) e também que pode discriminar pacientes com CP de pacientes com nódulos benignos, nossos resultados não demonstram que esta proteína poderia diferenciar pacientes com CDT de pacientes com nódulos benignos. dados demonstram, apenas que tumores menores estariam expressando mais VEGF-C. Este dado não era esperado, uma vez que essa proteína é classicamente relacionada a tumores maiores. Porém, em termos de progressão tumoral, estes tumores poderiam estar expressando a proteína justamente para progredir, crescer e invadir outros lugares. Devido ao tempo de acompanhamento relativamente curto, não pudemos relacionar VEGF-C ao prognóstico dos pacientes e ao aparecimento de metástases.

Em relação a análise conjunta dos três marcadores (Gal-3, VEGF e VEGF-C), encontramos um teste com valor preditivo positivo bastante razoável e que, inclusive, muito se assemelha ao que se usa atualmente como “padrão ouro” de diagnóstico do CDT, que são o exame de ultrassom e a PAAF. Um estudo de Papini *et al* (91) sugere que o US não deveria ser utilizado como método diagnóstico, uma vez que esse exame não permite fazer a diferenciação de nódulos benignos e malignos com precisão, já que a identificação de

estruturas que poderiam diferenciar malignidade, como a presença de margens irregulares ou de calcificações, apresenta baixa sensibilidade por este método, sendo 64% e 40%, respectivamente (91). Já em relação à PAAF, o valor preditivo positivo do teste, por exemplo, é de 75%, sendo que as lesões de padrão folicular ainda permanecem indefinidas com a utilização deste teste (92). Desta forma, embora nossos marcadores não apresentem resultados e valores muito superiores (Valor Preditivo Positivo: 89,5%), poderiam ser auxiliares no diagnóstico de malignidade tireoidiana. Para que isto acontecesse, seria necessário, ainda, avaliar se o custo-benefício deste teste é aplicável. No que diz respeito ao conforto para o paciente, sem dúvidas a coleta de sangue periférico é mais confortável do que a realização da PAAF. Porém, em relação aos custos destes testes, que ainda não estão disponíveis para compra em larga escala, apenas para pesquisa, talvez estes testes chegassem ao mercado com preços altos demais, que não fossem aplicáveis ao serviço de saúde pública, por exemplo. Deve-se considerar, ainda, que o Valor Preditivo Negativo deste teste foi baixo (27%), o que nos faz refletir se sua aplicabilidade clínica é viável, uma vez que não estaríamos identificando de forma adequada os indivíduos com nódulos benignos.

6 - RESUMO DOS ACHADOS

Dentre os marcadores de malignidade para nódulos da tiróide estudados, observamos que:

1. A identificação da mutação de *BRAF* em células tiroidianas circulantes não é possível com a metodologia por nós empregada. Não conseguimos identificar a mutação de *BRAF* em DNA extraído de leucócitos embora tal mutação estivesse presente em 4 de 10 pacientes testados.
2. Não encontramos expressão de TPO em sangue periférico de pacientes com CDT com os ensaios utilizados.
3. O nível sérico de GAL-3 pode auxiliar na diferenciação de malignidade entre os nódulos embora não tenha grande poder como marcador único
4. O nível sérico de VEGF pode auxiliar na diferenciação de malignidade entre os nódulos embora não tenha grande poder como marcador único.
5. O nível sérico de VEGF-C não foi útil na diferenciação de malignidade
6. Os níveis séricos de Gal-3, VEGF e VEGF-C parecem discriminar alguns grupos em relação a variáveis clínico-patológicas, porém não há indicação de que possam ser usados como marcadores para o CDT, uma vez que seus poderes preditivos positivo e negativo não são bons.
7. A combinação de Gal-3, VEGF e VEGF-C parece melhorar o Poder Preditivo Positivo das dosagens, porém, ainda não parece ser viável para aplicação clínica.

7 - CONCLUSÃO

Não encontramos marcadores séricos patognomônicos para o CDT, embora algumas proteínas pareçam distinguir alguns grupos de pacientes.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Welker MJ, Orlov D. Thyroid nodules. *Am Fam Physician*. 2003 Feb 1;67(3):559-66.
2. Knobel M, Medeiros-Neto G. [Disorders associated to chronic iodine deficiency]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Feb;48(1):53-61.
3. Tomimori E, Pedrinola F, Cavaliere H, Knobel M, Medeiros-Neto G. Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area. *Thyroid*. 1995 Aug;5(4):273-6.
4. Furlanetto TW, Peccin S, de OSMA, dos SZA, dos Reis PS, Genro SK, et al. [Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women]. *Rev Assoc Med Bras*. 2000 Oct-Dec;46(4):331-4.
5. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977 Dec;7(6):481-93.
6. Vander JB, Gaston EA, Dawber TR. Significance of solitary nontoxic thyroid nodules; preliminary report. *N Engl J Med*. 1954 Dec 9;251(24):970-3.
7. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med*. 1993 Feb 25;328(8):553-9.
8. Ramos AM, Sales Ade O, Barbalho de Mello LE, Cirino de Andrade M, Pinto Paiva F, Ramos CC, et al. Absence of peritumoral fibrosis or inflammatory infiltrate may be related to clinical progression of papillary thyroid microcarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2009 Dec;17(6):432-7.
9. Yuen AP, Ho AC, Wong BY. Ultrasonographic screening for occult thyroid cancer. *Head Neck*. 2010 Jul 19.

10. de Matos PS, Ferreira AP, Ward LS. Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series. *Endocr Pathol.* 2006 Summer;17(2):165-73.
11. Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med.* 1997 Feb 1;126(3):226-31.
12. Pinchera A. Thyroid incidentalomas. *Horm Res.* 2007;68 Suppl 5:199-201.
13. T. W. FURLANETTO SP, M. A. DE O. SCHNEIDER, A. DOS S. ZIMMER, P. S. DOS REIS, S. K. GENRO, E. V. FERREIRA, F. BITTELBRUM, A. S. MÜLLER, R. W. SILVA, I. R. SIQUEIRA, M. F. DA SILVEIRA. PREVALÊNCIA DE NÓDULOS DE TIREÓIDE DETECTADOS POR ECOGRAFIA EM MULHERES APÓS OS 40 ANOS. *Rev Ass Med Brasil* 2000;46(4):331-4.
14. Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocr Rev.* 2003 Feb;24(1):102-32.
15. Yu GP, Li JC, Branovan D, McCormick S, Schantz SP. Thyroid cancer incidence and survival in the national cancer institute surveillance, epidemiology, and end results race/ethnicity groups. *Thyroid.* 2010 May;20(5):465-73.
16. INCA. Instituto Nacional do Câncer (INCA). www2.inca.gov.br; 2009.
17. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro AP, Vaisman M. [Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005 Aug;49(4):503-9.
18. Cordioli MI, Canalli MH, Coral MH. Increase incidence of thyroid cancer in Florianopolis, Brazil: comparative study of diagnosed cases in 2000 and 2005. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009 Jun;53(4):453-60.

19. Burguera B, Gharib H. Thyroid incidentalomas. Prevalence, diagnosis, significance, and management. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000 Mar;29(1):187-203.
20. Schlumberger MJ, Torlantino M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000 Dec;14(4):601-13.
21. Sprague BL, Warren Andersen S, Trentham-Dietz A. Thyroid cancer incidence and socioeconomic indicators of health care access. *Cancer Causes Control.* 2008 Aug;19(6):585-93.
22. Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World J Surg.* 2010 Jan;34(1):28-35.
23. Morari EC, Leite JL, Granja F, da Assumpcao LV, Ward LS. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Nov;11(11):1485-8.
24. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett.* 2004 Jul 16;210(2):151-7.
25. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Lett.* 2004 Jun 25;209(2):129-37.
26. Granja F, Morari EC, Assumpcao LV, Ward LS. GSTO polymorphism analysis in thyroid nodules suggest that GSTO1 variants do not influence the risk for malignancy. *Eur J Cancer Prev.* 2005 Jun;14(3):277-80.

27. Bufalo NE, Santos RB, Cury AN, Andrade RA, Morari J, Morari EC, et al. Genetic polymorphisms associated with cigarette smoking and the risk of Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Jun;68(6):982-7.
28. Bufalo NE, Leite JL, Guilhen AC, Morari EC, Granja F, Assumpcao LV, et al. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13(4):1185-93.
29. Steemburgo T, Azevedo MJ, Martinez JA. [Gene-nutrient interaction and its association with obesity and diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009 Jul;53(5):497-508.
30. Sarinah B, Hisham AN. Primary lymphoma of the thyroid: diagnostic and therapeutic considerations. *Asian J Surg*. 2010 Jan;33(1):20-4.
31. Avenia N, Ragusa M, Cirocchi R, Puxeddu E, Cavaliere A, De Feo P, et al. Surgical treatment of primitive thyroid lymphoma. *Tumori*. 2009 Nov-Dec;95(6):712-9.
32. Knudson AG, Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*. 1985 Apr;45(4):1437-43.
33. Albertini RJ. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. *Mutat Res*. 1999 Jul 16;428(1-2):217-26.
34. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*. 1996 Apr;15(4):273-80.
35. Yuspa SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):341-4.
36. World Health Organization. 2001 [cited 2010 10/12/2010]; Available from: [://www.who.int/en/](http://www.who.int/en/).

37. Ishikawa T, Miwa M, Uchida K. Quantitation of thyroid peroxidase mRNA in peripheral blood for early detection of thyroid papillary carcinoma. *Thyroid*. 2006 May;16(5):435-42.
38. Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, et al. [Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jul;51(5):867-93.
39. Schlumberger M, Hitzel A, Toubert ME, Corone C, Troalen F, Schlageter MH, et al. Comparison of seven serum thyroglobulin assays in the follow-up of papillary and follicular thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2487-95.
40. Rosario PW, Purisch S. Does a highly sensitive thyroglobulin (Tg) assay change the clinical management of low-risk patients with thyroid cancer with Tg on T4 < 1 ng/ml determined by traditional assays? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Mar;68(3):338-42.
41. Cignarelli M, Ambrosi A, Marino A, Lamacchia O, Campo M, Picca G, et al. Diagnostic utility of thyroglobulin detection in fine-needle aspiration of cervical cystic metastatic lymph nodes from papillary thyroid cancer with negative cytology. *Thyroid*. 2003 Dec;13(12):1163-7.
42. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci*. 1994 Nov;19(11):474-80.
43. Rapp UR, Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, Choi WC, Pawson T, et al. raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1988;53 Pt 1:173-84.
44. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH, Jr., et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jul;80(14):4218-22.

45. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
46. James MR, Roth RB, Shi MM, Kammerer S, Nelson MR, Stark MS, et al. BRAF polymorphisms and risk of melanocytic neoplasia. *J Invest Dermatol*. 2005 Dec;125(6):1252-8.
47. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jun 5;1653(1):25-40.
48. Sithanandam G, Druck T, Cannizzaro LA, Leuzzi G, Huebner K, Rapp UR. B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man. *Oncogene*. 1992 Apr;7(4):795-9.
49. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1454-7.
50. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Apr 16;95(8):625-7.
51. Kumar R, Angelini S, Hemminki K. Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. *Oncogene*. 2003 Dec 18;22(58):9217-24.
52. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol*. 2004 Nov;183(2):249-56.
53. Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD. Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):718-27.

54. Begum S, Rosenbaum E, Henrique R, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol.* 2004 Nov;17(11):1359-63.
55. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5399-404.
56. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, et al. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett.* 2004 Jun 8;209(1):1-6.
57. Vaisman M, Rosenthal D, Carvalho DP. [Enzymes involved in thyroid iodide organification]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004 Feb;48(1):9-15.
58. Medeiros-Neto GA, Billerbeck AE, Wajchenberg BL, Targovnik HM. Defective organification of iodide causing hereditary goitrous hypothyroidism. *Thyroid.* 1993 Summer;3(2):143-59.
59. Hosoya T, Morrison M. A study of the hemoproteins of thyroid microsomes with emphasis on the thyroid peroxidase. *Biochemistry.* 1967 Apr;6(4):1021-6.
60. Taurog A. Thyroid peroxidase-catalyzed iodination of thyroglobulin; inhibition by excess iodide. *Arch Biochem Biophys.* 1970 Jul;139(1):212-20.
61. Taurog A. Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis. *Recent Prog Horm Res.* 1970;26:189-247.
62. Degroot LJ, Niepomniszcze H. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism.* 1977 Jun;26(6):665-718.

63. Moura EG, Rosenthal D, Carvalho-Guimaraes DP. Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. *Braz J Med Biol Res.* 1989;22(1):31-9.
64. Gerard CM, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE, et al. Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol.* 1989 Dec;3(12):2110-8.
65. José Miguel Silva Dora ELdSM, Lenara Golbert, Márcia Wagner, Ana Luiza Silva Maia. Marcadores moleculares de diferenciação da célula folicular nas neoplasias da glândula tireóide: papel das desidases 2003. Available from: file:///O:/Homepage/livro2/artigo_jose.htm.
66. Roddiger SJ, Bojunga J, Klee V, Stanisch M, Renneberg H, Lindhorst E, et al. Detection of thyroid peroxidase mRNA in peripheral blood of patients with malignant and benign thyroid diseases. *J Mol Endocrinol.* 2002 Dec;29(3):287-95.
67. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 19;1572(2-3):209-31.
68. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 1994 Feb 25;76(4):597-8.
69. Saussez S, Glinoyer D, Chantrain G, Pattou F, Carnaille B, Andre S, et al. Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid.* 2008 Jul;18(7):705-12.
70. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 1994 Aug 19;269(33):20807-10.
71. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1473(1):172-85.

72. Galectin-3 Information Center. [10 de dezembro de 2010]; Available from: www.galactin-3.net.
73. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 May 29;246(3):788-91.
74. Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, et al. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol*. 2002 May;32(5):1434-44.
75. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001 Jul;83(7):667-76.
76. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 19;1572(2-3):263-73.
77. Dumic J, Dabelic S, Fogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Apr;1760(4):616-35.
78. Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 19;1572(2-3):285-93.
79. Park YJ, Kwak SH, Kim DC, Kim H, Choe G, Park do J, et al. Diagnostic value of galectin-3, HBME-1, cytokeratin 19, high molecular weight cytokeratin, cyclin D1 and p27(kip1) in the differential diagnosis of thyroid nodules. *J Korean Med Sci*. 2007 Aug;22(4):621-8.
80. de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira Facuri F, Assumpcao LV, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*. 2005 Oct;47(4):391-401.

81. Isic T, Savin S, Cvejic D, Marecko I, Tatic S, Havelka M, et al. Serum Cyfra 21.1 and galectin-3 protein levels in relation to immunohistochemical cytokeratin 19 and galectin-3 expression in patients with thyroid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Dec;136(12):1805-12.
82. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 1992 Feb;13(1):18-32.
83. Li JL, Harris AL. Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications. *Front Biosci*. 2009;14:3094-110.
84. Yu XM, Lo CY, Lam AK, Leung P, Luk JM. Serum vascular endothelial growth factor C correlates with lymph node metastases and high-risk tumor profiles in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg*. 2008 Mar;247(3):483-9.
85. Vesely D, Astl J, Lastuvka P, Matucha P, Sterzl I, Betka J. Serum levels of IGF-I, HGF, TGFbeta1, bFGF and VEGF in thyroid gland tumors. *Physiol Res*. 2004;53(1):83-9.
86. Li Y, Nakamura M, Kakudo K. Targeting of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma (review). *Oncol Rep*. 2009 Oct;22(4):671-81.
87. Chuang TC, Chuang AY, Poeta L, Koch WM, Califano JA, Tufano RP. Detectable BRAF mutation in serum DNA samples from patients with papillary thyroid carcinomas. *Head Neck*. 2010 Feb;32(2):229-34.
88. Cradic KW, Milosevic D, Rosenberg AM, Erickson LA, McIver B, Grebe SK. Mutant BRAF(T1799A) can be detected in the blood of papillary thyroid carcinoma patients and correlates with disease status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Dec;94(12):5001-9.

89. Yu XM, Lo CY, Lam AK, Lang BH, Leung P, Luk JM. The potential clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in recurrent papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 2008 Dec;144(6):934-40; discussion 40-1.
90. Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, LeCouter J, Campa C, et al. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Feb;49(2):522-7.
91. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 May;87(5):1941-6.
92. Nobrega LH, Paiva FJ, Nobrega ML, Mello LE, Fonseca HA, Costa SO, et al. Predicting malignant involvement in a thyroid nodule: role of ultrasonography. *Endocr Pract*. 2007 May-Jun;13(3):219-24.



Comitê de Ética em Pesquisa CEP

Para: Dr. André Lopes Carvalho

De: Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 17/07/2009

Projeto de Pesquisa: **233/2009**

Prezado (a) Senhor (a),

Venho, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos analisou as pendências apontadas em reunião, referentes ao projeto **233/2009** intitulado : **“Avaliação da utilidade prática de potenciais marcadores séricos para o cancer de tireóide”** decidindo que o mesmo encontra-se **“Aprovado”**.

Atenciosamente,

*Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos*



CEP, 06/11/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 705/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0565.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE DE POSSÍVEIS MARCADORES SÉRICOS DE DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO PARA O CÂNCER BEM DIFERENCIADO DA TIRÓIDE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marjory Alana Marcello

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/09/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 06/11/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Verificar a utilidade de diversos genes e proteínas como marcadores de diagnóstico e/ou prognóstico para o câncer bem diferenciado da tireóide.

III - SUMÁRIO

Projeto de mestrado. Para avaliar os diferentes possíveis marcadores, serão analisadas amostras de sangue de 100 indivíduos com câncer de tireóide atendidos no ambulatório de Câncer de Tireóide, 50 indivíduos com nódulos benignos, e 150 indivíduos controles. As amostras de sangue dos pacientes (com câncer e nódulos benignos) serão realizadas em momentos em que eles necessitem realizar tais amostras para procedimentos relativos a seu tratamento/diagnóstico.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de setembro de 2008.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP.



**LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas
Departamento de Clínica Médica**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Prof^a Dra Laura Sterian Ward

Prof^a Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a) _____

_____ anos RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data: / /

Concordo em doar sangue e tecido para pesquisa de ácidos nucléicos e proteínas que podem estar envolvidas em doenças malignas e benignas da tireóide. A pesquisa tem por objetivo a melhor compreensão dos fatores moleculares de diagnóstico e prognóstico. Tal pesquisa justifica-se dada a importância da compreensão destes fatores para o tratamento dos pacientes. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados de meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam utilizados na pesquisa, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação. Meus dados e o material biológico advindo da coleta poderão ser usados em novas pesquisas, caso justificativa devida, sendo estas pesquisas aprovadas devidamente pelo CEP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, submissas totalmente à devida legislação. Tenho a garantia de sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam me provocar constrangimentos ou prejuízos, tornando anônimo o material ou dados obtidos. Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento das doenças tireoidianas no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora. Não terei nenhuma forma de reembolso, já que não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual. Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no contato ao CEP (infracitado), bem como denunciar quaisquer procedimentos que infrinjam as normas do CEP. Poderei obter esclarecimentos antes, durante e depois da realização da pesquisa sobre a mesma, contatando a pesquisadora responsável Profa. Dra. Laura S. Ward no contato abaixo.

Autorizo a guarda do material biológico para fins de pesquisas futuras? () Sim () Não

Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente

Prof^a Dra. Laura Sterian Ward: Coordenadora do GEMOCA- Clínica Médica/ FCM-
UNICAMP, CEP:13081-970, Campinas, SP, (19) 3521-8954, e-mail:ward@unicamp.br

CEP: Fone: (19) 3521-8938, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP,
e-mail: cep@fcm.unicamp.br