

CÁSSIO SLOMPO RAMOS

**AVALIAÇÃO DO USO DA GALECTINA-3, CITOQUERATINA 19 E HBME-1 NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÕES FOLICULARES DE TIREÓIDE**

CURITIBA

2007

CÁSSIO SLOMPO RAMOS

**AVALIAÇÃO DO USO DA GALECTINA-3, CITOQUERATINA-19 E HBME-1 NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÕES FOLICULARES DE TIREÓIDE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós -
Graduação em Medicina Interna do Depar-
tamento de Clínica Médica do Setor de
Ciências da Saúde da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Hans Graf

CURITIBA

2007

R175 Ramos, Cassio Slompo

Avaliação do uso da galectina-3, citoqueratina-19 e HBME-1
no diagnóstico diferencial de lesões foliculares de tireóide /
Cassio Slompo Ramos. – Curitiba, 2007.

54 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Hans Graf

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde.

Universidade Federal do Paraná.

1. Nódulo da glândula tireóide. 2. Galectina-3.
 3. Neoplasias da glândula tireóide. 4. Biomarcadores tumorais
- I. Graf, Hans. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do
Paraná. III. Título.

NLMC: WK 270



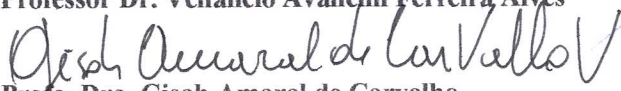
PARECER

Aos vinte e um dias do mês de setembro do ano de dois mil e sete, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores **Venâncio Avancini Ferreira Alves**, **Dra. Gisah Amaral de Carvalho** e **Dr. Hans Graf**, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Cássio Slompo Ramos**, do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde – Mestrado e Doutorado**, da **Universidade Federal do Paraná**, intitulada: **“AVALIAÇÃO DO USO DA GALECTINA-3, CITOQUERATINA-19 E HBME-1 NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÕES FOLICULARES DE TIREÓIDE”**. A Banca examinadora considerou que **Cássio Slompo Ramos**, apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 21 de setembro de 2007.



Professor Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves



Prof.ª Dra. Gisah Amaral de Carvalho



Prof. Dr. Hans Graf

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hans Graf pelo grande apoio, incentivo e ensinamento antes, durante e após a residência médica em Endocrinologia e especialmente na execução desta dissertação.

Ao Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles pelo ensinamento, incentivo e apoio na execução dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. César Luiz Boguszewski, que auxiliou em minha formação acadêmica e contribuiu para despertar o interesse pela pesquisa.

Ao grupo de estudos em doenças da Tireóide do SEMPR, principalmente a Prof. Dra. Gisah Amaral de Carvalho, Dr. Cleo Otaviano Mesa Jr e Dr. Helton Estrela Ramos pelas orientações e sugestões nesse trabalho.

À Janir Terezinha Marchi e Julie Lílian Pimentel pelo grande auxílio na realização da técnica em imuno-histoquímica.

À secretária Elisabete K. Coelho pela amizade e apoio.

À equipe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR que contribuiu para que essa dissertação fosse realizada.

Aos meus pais Renato José Ramos e Cleusi Slompo Ramos pelo amor, educação e apoio na minha vida.

À minha esposa Juliana, pelo amor e existência em minha vida.

Ao Dr. Ramón Ignacio Romero Rojas, Olga S. Romero Rojas e Ana Flavia pelo carinho e apoio.

Aos meus irmãos e cunhadas Maurício e Karyme, Fábio e Renata e o Cláudio pelo carinho e apoio.

Aos meus sobrinhos Michelle e Rafael por alegrarem nossa vida.

Aos meus colegas de Residência Médica, Claudio Silva de Lacerda e José Ronaldo Mayer Júnior, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos.

SUMÁRIO

LISTA DE FOTOGRAFIAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Doença Nodular da Tireóide	12
2.2 Diagnóstico do Nódulo da Tireóide	12
2.3 Classificação dos Tumores Tireoidianos	13
2.4 Carcinoma Papilífero	14
2.5 Adenoma Folicular	16
2.6 Carcinoma Folicular	16
2.7 Tireoidite de Hashimoto	17
2.8 Imuno-histoquímica	18
2.8.1 Galectina-3	18
2.8.2 Citoqueratina-19	21
2.8.3 HBME-1	22
2.12 Painéis Imunoistoquímicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Casuística e análise morfológica	25
3.2 Avaliação morfológica e imuno-histoquímica	25
3.2.1 Técnica Imuno-histoquímica	26
3.3 Análise Estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Imuno-histoquímica para galectina-3	29
4.2 Imuno-histoquímica para Citoqueratina-19	31
4.3 Imuno-histoquímica para HBME-1	34
4.4 Imuno-histoquímica para galectina-3 e citoqueratina-19	36
4.5 Imuno-histoquímica para galectina-3 e HBME-1	37
4.6 Imuno-histoquímica para citoqueratina-19 e HBME-1	38
4.7 Imuno-histoquímica para galectina-3, citoqueratina-19 e HBME-1	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES	45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	
ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	54
ANEXO 2 – PLANILHA UTILIZADA PARA REVISÃO HISTOLÓGICA DAS LÂMINAS	56
ANEXO 3 – PLANILHA UTILIZADA PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA	58
ANEXO 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DA TIREÓIDE SEGUNDO “<i>WORLD HEALTH ORGANIZATION</i>”	60
ANEXO 5 – DADOS INDIVIDUAIS SOBRE CADA MARCADOR	62

LISTA DE FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFIA 1 – GAL-3 no Carcinoma Papilífero de Tireóide	30
FOTOGRAFIA 2 – GAL-3 no Carcinoma Folicular de Tireóide	31
FOTOGRAFIA 3 – CK-19 no Carcinoma Papilífero de Tireóide	32
FOTOGRAFIA 4 – CK-19 na Tireoidite de Hashimoto	33
FOTOGRAFIA 5 – HBME-1 no Carcinoma Folicular de Tireóide	35
FOTOGRAFIA 6 – HBME-1 no Bócio Colóide	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Positividade da Imuno-histoquímica para GAL-3	29
TABELA 2 – Positividade da Imuno-histoquímica para GAL-3 nos Tumores Benignos e Malignos da Tireóide	30
TABELA 3 – Positividade da Imuno-histoquímica para CK-19	32
TABELA 4 – Positividade da Imuno-histoquímica para CK-19 nos Tumores Malignos e Benignos da Tireóide	32
TABELA 5 – Positividade da Imuno-histoquímica para HBNE-1	34
TABELA 6 – Positividade da Imuno-histoquímica para HBME-1 Nos Tumores Benignos e Malignos da Tireóide	35
TABELA 7 – Positividade da Imuno-histoquímica para GAL-3 e CK-19 nos Tumores Benignos e Malignos da Tireóide	37
TABELA 8 – Positividade da Imuno-histoquímica para GAL-3 e HBME-1 nos Tumores Benignos e Malignos da Tireóide	37
TABELA 9 – Positividade da Imuno-histoquímica para CK-19 e HBME-1 nos Tumores Benignos e Malignos da Tireóide	38
TABELA 10 – Positividade da Imuno-histoquímica para GAL-3, CK-19 e HBME-1 nos Tumores Benignos e Malignos da Tireóide	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFT	Carcinoma folicular da tireóide
CK-19	Citoqueratina-19
CPT	Carcinoma papilífero da tireóide
GAL-3	Galectina-3
HBME-1	<i>Hector Battifora Mesothelial Cell</i>
KS	Keratan-sulfato
PAAF	Punção aspirativa com agulha fina
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
SEMPR	Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
TPO	Tireoperoxidase
UFPR	Universidade Federal do Paraná
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

A punção aspirativa com agulha fina (PAAF) é uma técnica diagnóstica bem estabelecida na investigação pré-operatória de nódulos tireoidianos, permitindo uma diminuição significativa no número de procedimentos cirúrgicos da tireóide. Porém, uma importante limitação da PAAF é a falta de sensibilidade na avaliação de neoplasias foliculares devido à incapacidade em diferenciar lesões foliculares benignas das lesões foliculares malignas da tireóide. A dificuldade encontrada no diagnóstico diferencial das lesões foliculares fez com que vários marcadores fossem testados, sendo os mais promissores a galectina-3 (GAL-3), a citoqueratina-19 (CK-19) e o anticorpo contra as células mesoteliais (HBME-1). O objetivo deste estudo foi avaliar o papel dos marcadores GAL-3, CK-19 e HBME-1 no diagnóstico diferencial de lesões foliculares de tireóide em espécimes cirúrgicos do Hospital de Clínicas da UFPR no período de 1985 a 2004. Foram selecionadas 32 peças cirúrgicas de pacientes com diagnóstico inicial de lesão folicular (18 lesões malignas e 14 lesões benignas), submetidas ao teste imuno-histoquímica com a GAL-3, CK-19 e HBME-1. Os resultados mostraram que o único marcador isolado capaz de auxiliar no diagnóstico diferencial das lesões foliculares foi a CK-19, que mostrou uma sensibilidade de 61,1%, especificidade de 85,7% e uma acurácia diagnóstica de 62,5% ($p < 0,05$). Dentre as diversas combinações entre os marcadores, a que teve a melhor sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica (66,7%, 78,6%, 71,9%, respectivamente) foi a GAL-3 com a CK-19 ($p < 0,05$). Concluímos que o diagnóstico diferencial das lesões foliculares de tireóide pode ser melhorado com o uso dos marcadores imuno-histoquímicas e que o uso de um painel de marcadores aumenta a sensibilidade e especificidade deste método diagnóstico.

Palavras-chave: lesão folicular, galectina-3, citoqueratina-19, HBME-1

ABSTRACT

Fine-needle aspiration biopsy (FNAB) is a well characterized diagnostic tool in the pre-operative investigation of thyroid nodules, which allowed a significant decrease in the number of surgical procedures of the thyroid. However, an important limitation of FNAB is the lack of sensitivity in the differentiation of malignant from benign follicular lesions of thyroid. The difficulty of FNAB in establishing the differential diagnosis of follicular lesions led to the attempt of using several tumor markers. The most promising are galectin-3 (GAL-3), cytokeratin-19 (CK-19) and Hector Battifora Mesothelia cell (HBME-1). The aim of this study was to evaluate the role of the tumor markers GAL-3, CK-19 and HBME-1 in the differential diagnosis of thyroid follicular lesions in surgical blocks from patients of Hospital de Clinicas of the Federal University of Parana submitted to thyroid surgery from 1985 to 2004. We selected 32 surgical blocks of patients with a initial diagnosis of follicular lesion (18 malignant lesions and 14 benign lesions) and submitted them to immunohistochemical tests with GAL-3, CK-19 and HBME-1. The results showed that the only isolated marker able to help in the differential diagnosis of follicular lesions was CK-19, which showed a sensitivity of 61,1%, especificity of 85,7% and a diagnostic accuracy of 62,5% ($p < 0.05$). Among all the possible combinations of the three markers, the best sensitivity, specificity and diagnostic accuracy (66,7%, 78,6%, 71,9%, respectively) was with GAL-3 and CK-19 ($p < 0,05$). We concluded that the differential diagnosis of thyroid follicular lesions can be improved with the use of immunohistochemical markers and that a panel of markers is usefull to increase the sensitivity and specificity of this diagnostic method.

Key-words: follicular lesion, galectin-3, cytokeratin-19, HBME-1

1 INTRODUÇÃO

A punção aspirativa com agulha fina (PAAF) é uma técnica diagnóstica bem estabelecida na investigação pré-operatória de nódulos tireoidianos, permitindo uma diminuição significativa no número de procedimentos cirúrgicos da tireóide. [NASSER, 2000] Porém, uma importante limitação da PAAF é a falta de sensibilidade na avaliação de neoplasias foliculares devido a sua incapacidade em diferenciar lesões foliculares benignas das lesões foliculares malignas da tireóide. [ORLANDI *et al*, 1998]

A dificuldade encontrada no diagnóstico diferencial das lesões foliculares fez com que vários marcadores fossem testados, sendo os mais promissores a galectina-3 (GAL-3), a citoqueratina-19 (CK-19) e o anticorpo contra células mesoteliais (HBME-1). [MATOS *et al*, 2005]

A GAL-3 é um polipeptídeo, membro da família das lecitinas animais ligadoras de B-galactosídeos, consistindo de um domínio amino-terminal, rico em prolina e glicina e um domínio carboxi-terminal de reconhecimento de carboidratos. É expressa em muitos tecidos e tipos celulares, onde está localizada no núcleo e/ou citoplasma, na superfície celular ou no ambiente extracelular. A Galectina-3 tem um papel em diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo a adesão célula-célula e a adesão célula-matriz, crescimento celular, transformação neoplásica, desenvolvimento de metástases, regulação do ciclo celular, reparo do dano celular e apoptose. [SAGGIORATO *et al*, 2001]. Além disso, ela foi detectada em carcinomas de tireóide humanos, porém não em tumores benignos ou na glândula normal. [BARTOLAZZI *et al*, 2001]

A CK-19 é uma proteína citoesquelética, encontrada em várias células epiteliais normais e tumorais. Na neoplasia de tireóide, sua expressão está limitada aos carcinomas papilíferos. Seu papel no diagnóstico diferencial das lesões foliculares é na distinção entre o adenoma folicular e a variante folicular do carcinoma papilífero. [BEESLEY *et al*, 2002]

O HBME-1 é um anticorpo monoclonal dirigido contra células mesoteliais epiteliais malignas, reagindo com a superfície microvilosa das células epiteliais e sua expressão foi relatada nos carcinomas folicular e papilífero de tireóide, mas não nas células tireoidianas normais. [CHEUNG *et al*, 2001]

A partir da descoberta desses marcadores, vários trabalhos foram realizados na tentativa de identificar um marcador, ou um conjunto de marcadores que pudesse ser útil na diferenciação pré-operatória das lesões foliculares da tireóide e também na classificação histológica definitiva. Porém, ainda não existe um consenso sobre quais marcadores devem ser utilizados.

O objetivo desse estudo foi avaliar na nossa população qual seria a efetividade da utilização de um painel imunoistoquímico constituído de três marcadores, a GAL-3, a CK-19 e o HBME-1, no diagnóstico diferencial dos tumores foliculares da tireóide.

1.1 OBJETIVO

1) Avaliar o papel dos marcadores galectina-3, citoqueratina 19 e HBME-1 no diagnóstico diferencial de lesões foliculares em espécimes cirúrgicos do Hospital de Clínicas da UFPR no período de 1985 a 2004.

2) Correlacionar o perfil imunoistoquímico (galectina-3, citoqueratina-19 e HBME-1) das lesões foliculares da tireóide diagnosticadas pela punção aspirativa de agulha fina (PAAF) com o diagnóstico anátomo-patológico da peça cirúrgica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença Nodular da Tireóide

Os tumores da tireóide constituem a neoplasia endócrina mais comum. A maioria dos nódulos da tireóide são benignos, caracterizados como bócio colóide, porém 5 a 20% dos nódulos são neoplasias verdadeiras, tanto adenomas como carcinomas das células foliculares. A prevalência dos nódulos de tireóide é 3 a 4 vezes maior nas mulheres que nos homens. Nódulos múltiplos são mais comuns que os nódulos solitários. [ASA, 2005]

O carcinoma da tireóide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino, contribuindo com 1% de todas as neoplasias malignas em países desenvolvidos. As lesões malignas da tireóide ocorrem primariamente em adultos jovens e de meia-idade, sendo raras em crianças. [STEWART, 2003]

2.2 Diagnóstico do Nódulo da Tireóide

Na avaliação dos nódulos da tireóide é importante a anamnese do paciente, um exame físico cuidadoso, suplementado por testes laboratoriais e/ou exames de imagem e, principalmente, a punção aspirativa com agulha fina (PAAF).

A PAAF é o principal método diagnóstico dos nódulos de tireóide com uma sensibilidade e especificidade superior a 90% em áreas iodo-suficientes. A técnica é fácil e segura, com raros casos de complicações na literatura. [HAMBURGER, 1994] Uma punção adequada deve conter pelo menos 5 a 6 grupos celulares, cada um deles contendo 10 a 15 células foliculares. [GHARIB *et al*, 1993]

Os resultados da PAAF podem ser classificados clinicamente como benignos, malignos, suspeitos ou insatisfatórios. Os aspirados benignos incluem

principalmente o nódulo colóide e tireoidite. A categoria maligna inclui o carcinoma papilífero, carcinoma medular, carcinoma indiferenciado, linfoma, metástases para a tireóide e outros tipos de tumores.

Entretanto, uma importante limitação da PAAF é a falta de sensibilidade na avaliação das neoplasias foliculares da tireóide, devido a sua incapacidade em diferenciar lesões foliculares benignas das lesões foliculares malignas. Portanto, as neoplasias foliculares são colocadas na categoria suspeita. [SAGGIORATO *et al*, 2001]

O padrão ouro no diagnóstico dos tumores persiste sendo o diagnóstico anátomo-patológico. Um laudo anátomo-patológico ideal deve conter: tipo de espécime (exemplo: lobectomia tireoidiana à direita), designação anátomo-patológica, o maior diâmetro do tumor, presença ou ausência de cápsula, localização, presença ou ausência de infiltração angiolinfática, presença ou ausência de extensão extra-tumoral, estados das margens cirúrgicas, presença ou ausência de paratireóides e o estadiamento tumoral. [BACCHI *et al*, 2005]

2.3 Classificação dos Tumores Tireoidianos (Anexo 4)

Uma das mais tradicionais classificações dos tumores tireoidianos é a adotada pela “World Health Organization Classification of Tumours” (WHO), que separa o carcinoma de tireóide em grandes grupos como papilífero, folicular, medular e indiferenciado ou anaplásico, baseando-se em características morfológicas e clínicas. [WHO, 2004]

Esta classificação define os subtipos especiais de carcinomas de tireóide como o carcinoma de células escamosas, o carcinoma mucoepidermóide, o carcinoma esclerosante mucoepidermóide com eosinofilia e o carcinoma mucinoso. [WHO, 2004]

Os tumores benignos da tireóide são classificados como adenomas foliculares ou tumores trabeculares hialinizantes. [WHO, 2004]

A classificação da WHO menciona especialmente os tumores ricos em células oxifílicas, tradicionalmente, chamados de tumores de células de Hurthle, que, freqüentemente, são classificados como pertencentes à família folicular, porém quando apresentam características nucleares típicas como inclusões nucleares e fendas, devem ser classificados como carcinomas papilíferos ricos em células oxifílicas [WHO, 2004]

2.4 Carcinoma Papilífero

O carcinoma papilífero da tireóide (CPT) é a neoplasia mais comum do epitélio folicular da tireóide. É um tumor epitelial maligno que apresenta evidências de diferenciação das células foliculares e é caracterizado pela formação de papilas e/ou por um conjunto de características nucleares peculiares. [CHEUNG *et al*, 2001]

A maioria dos tumores surgem em adultos entre 20 e 50 anos, com uma prevalência 4 vezes maior nas mulheres do que nos homens [WHO, 2001]. Esse predomínio feminino é menor após os 50 anos. Existe uma forte relação entre a exposição à irradiação cervical e o desenvolvimento subsequente do carcinoma papilífero da tireóide.

As características celulares do CPT incluem um aumento ou formato oval do núcleo, o qual, tipicamente, apresenta clareamento ou um padrão em “vidro fosco”. As irregularidades nucleares incluem as fendas e as pseudo-inclusões nucleares.

Outra estrutura classicamente associada ao CPT é o corpo psamomatoso que se caracteriza por calcificações arredondadas que exibem laminações concêntricas. Os corpos psamomatosos são encontrados associados a células tumorais, dentro dos espaços linfáticos ou dentro do estroma tumoral [JOHANNESSEN *et al*, 1980]

O CPT tem disseminação predominantemente linfática, sendo comum o achado de metástases em linfonodos regionais ao diagnóstico. Além disso, focos microscópicos do tumor são comumente encontrados na tireóide, topograficamente separados da massa tumoral principal, como resultado da disseminação linfática intraglandular ou, raramente, uma origem multifocal e multiclonal. [WHO, 2004]

A variante folicular do CPT possui uma arquitetura folicular e alterações nucleares típicas do CPT, porém com, virtualmente, ausência de estruturas papilares. O diagnóstico desta variante do CPT pode ser confundido com o adenoma folicular e com o CFT, entrando no diagnóstico diferencial das lesões foliculares da tireóide. [ASA, 2005]

Kimura e colaboradores descreveram em 2003 a existência das mutações no gene BRAF no CPT. As mutações ativadoras no gene BRAF são as anormalidades oncogênicas mais comuns identificadas no CPT. BRAF é o ativador mais potente da via da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). A mutação transversa T1799A do gene *BRAF*, que causa uma substituição de aminoácido V600E na proteína BRAF, representa mais de 90% das mutações BRAF no CPT. [KIMURA *et al*, 2003; ESPINOSA *et al*, 2007; GIANINNI *et al*, 2007]

Outras alterações genéticas encontradas no CPT são os rearranjos cromossômicos do gene RET, chamados RET/PTC. Estes rearranjos são encontrados em uma frequência variável, dependendo de fatores geográficos e exposição à radiação. Além disso, as mutações ativadoras do gene RAS, hiperexpressão do c-met e diminuição da regulação da E-caderina também desempenham um papel na patogênese do CPT. [SOBRINHO-SIMÕES *et al*, 2005]

2.5 Adenoma Folicular

As lesões foliculares da tireóide podem ser benignas ou malignas. As lesões benignas incluem os adenomas foliculares ou áreas hiperplásicas de um bócio colóide. Os adenomas foliculares são, geralmente, solitários, encapsulados e sem evidência de invasão capsular ou vascular. Eles são classificados baseados no seu padrão de crescimento como macrofolicular, microfolicular ou trabecular.

Os adenomas foliculares que apresentam 75% ou mais de células eosinofílicas, ricas em mitocôndrias, são chamados de adenomas foliculares ricos em células oxifílicas ou adenomas de células de Hürthle. [VOLANTE *et al*, 2004]

A distinção entre adenoma folicular e carcinoma folicular baseia-se, unicamente, na demonstração de presença de invasão capsular e/ou invasão vascular. Para ser caracterizado invasão capsular, o tumor deve penetrar toda a espessura da cápsula e para caracterizar uma invasão vascular este vaso deve estar localizado dentro da cápsula ou adjacente a mesma, deve ser um vaso de grande calibre e deve estar recoberto por células endoteliais. [WHO, 2004]

Os adenomas foliculares podem ter características moleculares semelhantes aos do carcinoma folicular, como as mutações RAS e a translocação PAX-8-PPAR γ . [SOBRINHO-SIMÕES *et al*, 2005]

2.6 Carcinoma Folicular

O carcinoma folicular da tireóide (CFT) é um tumor epitelial maligno que mostra evidência de diferenciação das células foliculares. O CFT é responsável por aproximadamente 5% dos casos de câncer de tireóide em regiões com dieta suficiente em iodo. Em áreas endêmicas por deficiência de iodo essa porcentagem aumenta, chegando a 25 a 40% dos casos de câncer de tireóide. [ROSAI *et al*, 1992]

Essa neoplasia é mais prevalente nas mulheres, com uma média de idade 10 anos maior que o carcinoma papilífero. Tipicamente, apresenta-se como nódulo tireoidiano solitário.

A disseminação do carcinoma folicular é feita via hematogênica e caracteristicamente ocorre metástases para os ossos, pulmões, cérebro e fígado. [LIVOLSI *et al*, 2004]

As características moleculares mais peculiares do carcinoma folicular são a proeminência de aneuploidia e a grande prevalência das mutações RAS e dos rearranjos PAX-8/PPAR γ . [SOBRINHO-SIMÕES *et al*, 2005]

2.7 Tireoidite de Hashimoto

Alterações focais e incompletas similares às alterações nucleares do CPT foram descritos nos tireócitos da tireoidite de Hashimoto, porém encontradas somente na minoria dos folículos desta lesão. [BERTHO *et al*, 1995]

A infiltração linfocítica ou a tireoidite de Hashimoto clássica está presente em 30 a 58% dos CPT, 20% dos CFT e 14% dos adenomas foliculares. [TAMIMI *et al*, 2002] Porém, a incidência de carcinoma da tireóide em uma tireoidite de Hashimoto varia de menos de 1% até 32% quando na presença de um nódulo frio isolado. [PRASAD *et al*, 2004]

A relação causal entre a tireoidite de Hashimoto e, principalmente, o CPT ainda é um assunto controverso. Existem evidências mostrando que o processo auto-imune ocorre em resposta ao CPT, servindo para impedir a disseminação tumoral, porém outros autores já encontraram alterações moleculares do RET/PTC em células da tireoidite linfocítica. [TAMIMI *et al*, 2002]

2.8 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica estuda a expressão das proteínas e sua localização celular. A disponibilidade de vários anticorpos especificamente dirigidos contra antígenos e células permite uma melhor definição das características dos tecidos normais e doentes. [FAGGIANO *et al*, 2007]

As principais indicações do estudo imunoistoquímico são a discriminação da expressão normal versus anormal de determinadas proteínas, podendo levar a subtipagem de neoplasias e a sua avaliação prognóstica. [ALVES *et al*, 1999]

Vários marcadores de malignidade já foram investigados nas lesões foliculares da tireóide, porém todos eles possuem vantagens e desvantagens. Dentre os mais promissores, a GAL-3, HBME-1 (*Hector Battifora Mesothelial cell*) e a CK-19 foram os mais utilizados para uma melhor definição das patologias tireoidianas [MATOS *et al*, 2005].

2.8.1 Galectina-3

A galectina-3 (GAL-3) é membro da família das lecitinas, definidas como proteínas ligadoras de carboidratos. Possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidratos, apresentam uma seqüência significativamente homóloga e uma grande afinidade aos beta-galactosídeos. Existem mais de 13 tipos de galectinas descritos nos mamíferos. [CALICIFE *et al*, 2004]

A GAL-3 foi primeiro identificada como um marcador de diferenciação do macrófago Mac-2. O peso molecular dessa proteína monomérica varia entre 26 e 31 kDa. A GAL-3 consiste de 3 domínios: um domínio N-terminal; um domínio composto de 10 aminoácidos ricos em prolina, glicina e tirosina; e um domínio C-terminal. [CALIFICE *et al*, 2004]

A GAL-3 é expressa pelos monócitos e pelos macrófagos, bem como em uma variedade de células epiteliais, onde está localizada no núcleo e/ou citoplasma ou na superfície celular. A GAL-3 tem um papel em diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo a adesão célula-célula e a adesão célula-matriz, ativação de neutrófilos e macrófagos, crescimento celular, transformação neoplásica, metástases, regulação do ciclo celular, reparo do dano celular e apoptose. [SAGGIORATO *et al*, 2001]

A expressão da GAL-3 é modulada por vários estímulos oncogênicos, e mostrou-se mais acentuada em diferentes tipos de tumores, incluindo o linfoma de grandes células, carcinoma hepatocelular, carcinoma colo-retal, carcinoma de mama, tumores cerebrais, melanoma e finalmente, no carcinoma de tireóide. Na tireóide, sua expressão estaria restrita aos tumores das células foliculares. Nos tumores benignos da tireóide, a expressão da GAL-3 foi inicialmente relatada como negativa, mas estas observações não foram confirmadas por outros autores. [VOLANTE *et al*, 2004]

Nos carcinomas de tireóide, a localização da GAL-3 é, principalmente, citoplasmática, porém algumas vezes está associada à expressão nuclear. Alguns estudos demonstraram que a expressão citoplasmática da GAL-3 foi detectada em carcinomas papilíferos e na maioria dos carcinomas foliculares, mas não foi detectada nos adenomas foliculares. [ORLANDI *et al*, 1998]

O efeito da GAL-3 na adesão celular à laminina é variável de acordo com o tipo de célula utilizado, variando da promoção da adesão celular, da ausência do efeito até a diminuição da adesão. [CALICIFE *et al*, 2004]

O maior trabalho realizado com a GAL-3 foi feito por BARTOLAZZI e colaboradores, os quais mostraram a expressão da GAL-3 em mais de 1000 espécimes de tecido tireoidiano, incluindo 226 preparações citológicas obtidas através da PAAF, evidenciando uma expressão positiva na grande maioria dos carcinomas bem diferenciados de origem folicular, mostrando uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 98% na diferenciação entre lesões foliculares benignas e malignas. [BARTOLAZZI *et al*, 2001]

XU e colaboradores identificaram que as neoplasias tireoidianas malignas, tanto papilíferas como foliculares, expressam altos níveis de GAL-3. Ao contrário, nenhuma das 32 lesões benignas avaliadas nesse trabalho, mostrou expressão da GAL-3. ORLANDI e colaboradores compararam os níveis de expressão de GAL-3 em PAAF pré-cirúrgicas e nos respectivos espécimes cirúrgicos, achando expressão da GAL-3 em todos os 18 pacientes com neoplasia maligna. [BERNET *et al*, 2002]

Porém, outros estudos mostraram que a GAL-3 também teve um aumento de expressão em tumores benignos da tireóide e na tireoidite de Hashimoto. CVEJIC e cols demonstraram que 36% dos adenomas foliculares expressaram GAL-3; COLI e cols mostraram que 63% dos adenomas foliculares também foram positivos para a GAL-3. O que mostra uma baixa especificidade da GAL-3 na detecção do carcinoma de tireóide. [CVEJIC *et al*, 1998 ; COLI *et al*, 2002]

Na tireoidite de Hashimoto, os estudos mostram uma positividade maior da GAL-3 nas células foliculares com alterações nucleares similares as do carcinoma papilífero da tireóide, onde até 87% de positividade foi relatada. [PRASAD *et al*, 2004]

Foi sugerido que a imuno-reatividade encontrada nos adenomas foliculares esteja relacionada com uma transformação maligna incipiente, explicando a alta proporção de positividade encontrada nos adenomas foliculares nesses estudos. [MEHROTRA *et al*, 2004]

MARTINS e colaboradores utilizaram a técnica de reação de cadeia de polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*) para avaliar a eficiência da expressão da proteína da GAL-3 como um marcador molecular de malignidade na diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide e, após estudarem 23 pacientes, obtiveram uma expressão de 100% nos carcinomas de tireóide, 80% nos bóciós multinodulares e 60% dos adenomas. Este resultado foi confirmado em outros estudos com a mesma metodologia. [TAKANO *et al*, 2003; MARTINS *et al*, 2002]

As técnicas baseadas em PCR, apesar de altamente sensíveis, não conseguem distinguir a positividade citoplasmática ou nuclear da GAL-3 e nem o

tipo celular expressando a GAL-3. Assim, partindo-se do princípio que os macrófagos e as células endoteliais produzem GAL-3 em condições fisiológicas, estes tipos celulares provavelmente estão presentes no tecido submetido à análise por PCR, a despeito de sua natureza benigna ou maligna. [VOLANTE *et al*, 2004]

2.8.2 Citoqueratina-19

As proteínas do citoesqueleto são marcadores úteis na avaliação dos tipos celulares e no diagnóstico dos tumores. Para a identificação das células epiteliais, uma classe de filamentos de tamanho intermediário (7 a 10 nm), formada pelas citoqueratinas, é bastante valiosa. As proteínas com este tamanho intermediário, geralmente, continuam a ser expressas no epitélio neoplásico.

A CK-19 é uma proteína citoesquelética com menor peso molecular, encontrada em várias células epiteliais normais e tumorais. Na neoplasia de tireóide, sua expressão ocorre, principalmente, nos CPT. Seu papel no diagnóstico diferencial das lesões foliculares é na distinção entre o adenoma folicular e a variante folicular do carcinoma papilífero. [BEESLEY *et al*, 2002]

A CK-19 é um marcador sensível para os carcinomas papilíferos, geralmente, com uma reatividade plasmáticas difusa forte. A CK-19 também é expressa focalmente no epitélio tireoidiano normal, na tireoidite de Hashimoto e em alguns tumores benignos. [CHEUNG *et al*, 2001]

SAHOO e colaboradores demonstraram uma positividade em todos os 15 CPT avaliados, sendo 14 deles com uma positividade para a CK-19 em mais de 75% das células e 1 com uma positividade moderada, entre 5 e 25% das células. Porém, nesse mesmo estudo, dos 20 adenomas foliculares analisados, 15 tiveram menos que 5% das células positivas para a CK-19, 1 mostrou uma positividade entre 5 a 25% e 4 tiveram positividade entre 25 e 75%. Portanto, a reatividade da CK-19 não é específica para o CPT, mas o padrão de reação é mais difuso nesse tipo de tumor que no adenoma folicular.

CHEUNG e colaboradores demonstraram uma imuno-reatividade difusa em 66% dos carcinomas papilíferos da tireóide, positividade difusa em 3 casos de carcinoma insular e 2 CFT ricos em células oxifílicas. Além disso, um caso de adenoma folicular apresentou uma reatividade forte difusa, com um significado ainda incerto.

2.8.3 HBME-1

O HBME-1 é um anticorpo monoclonal dirigido contra células mesoteliais epiteliais malignas, reagindo com a superfície microvilosa das células epiteliais. Este marcador é útil para o diagnóstico das neoplasias mesoteliais e mostra uma positividade, também, no epitélio traqueal normal e no adenocarcinoma de pulmão, pâncreas e glândula mamária. [MASE *et al*, 2003]

Na maioria dos estudos envolvendo a tireóide, a imuno-histoquímica com HBME-1 mostrou-se positiva para quase todos os carcinomas folicular e papilíferos de tireóide, mas não nas células tireoidianas normais. CHEUNG e colaboradores demonstraram uma imuno-reatividade de 54% nas lesões malignas derivadas do epitélio folicular e todas as lesões benignas foram negativas. ROSSI e colaboradores avaliaram 100 lesões tireoidianas, sendo 42 lesões malignas e 58 lesões benignas e o HBME-1 mostrou uma sensibilidade de 92,8% e uma especificidade de 98,2% no diagnóstico das lesões malignas da tireóide.

A reatividade do HBME-1 parece diminuir na presença de células de Hürthle e com alterações apócrinas, provavelmente devido a uma ausência de glicoproteínas de superfície específicas para este marcador. MAI e colaboradores, após avaliarem mais de 200 casos de tumores de células de Hürthle, notaram uma positividade menor que 10% nesse tipo de lesão tireoidiana. [MAI *et al*, 2002; MATOS *et al*, 2005).

2.8.4 Painéis Imunoistoquímicos

A avaliação imuno-histoquímica utilizando marcadores de forma isolada mostrou resultados discrepantes para a análise das lesões foliculares. Em função disto, atualmente a tendência é que se tenha um painel diagnóstico para avaliação das lesões foliculares. [SAGGIORATO *et al*, 2005]

A presença de dois mecanismos alternativos de tumorigênese no CFT foi postulada por alguns autores: a presença do rearranjo cromossômico PAX8-PPAR γ (associado com GAL-3 +/HBME-1 -) e a presença da mutação RAS (associado com GAL-3 -/HBME-1 +). Estes dados sugerem que um painel de diagnóstico para tumores foliculares deveria incluir no mínimo a galectina e o HBME-1. [NIKIFOROVA *et al*, 2003]

Um painel imunoistoquímico utilizando a GAL-3 e o HBME-1 foi utilizado por VOLANTE e colaboradores, que avaliaram 152 tumores oxifílicos da tireóide e mostraram uma sensibilidade de 99% e uma especificidade de 80% na distinção entre tumores oxifílicos malignos e benignos.

PRASAD e colaboradores sugeriram um painel composto por GAL-3, fibronectina-1, CITED-1, HBME-1 e CK-19. Após avaliarem 215 lesões tireoidianas, estes autores concluíram que todos os 5 marcadores foram altamente específicos no diagnóstico diferencial entre lesões malignas e benignas de tireóide, com uma especificidade maior que 90% para os carcinomas. Além disso, todos os carcinomas foram positivos para GAL-3, fibronectina-1 e/ou HBME-1 e quando o painel mostrava fibronectina-1 e GAL-3 negativos ou fibronectina-1 e HBME-1 negativos, ele foi altamente específico para adenoma tireoidiano.

MATOS e colaboradores utilizaram um painel imunoistoquímico utilizando a GAL-3, HBME-1 e a CK-19. Após estudarem um total de 170 lesões tireoidianas, divididas em 148 lesões neoplásicas e 22 lesões não neoplásicas, mostraram que o melhor marcador, em termos de sensibilidade e especificidade, foi o HBME-1, que foi positivo em 63,1% dos CFT, porém foi positivo também em 33,3% dos nódulos adenomatóides e em 55% dos adenomas foliculares. Quando os 3

marcadores foram utilizados, existiu uma positividade em 96,4% dos CPT e em 63,1% dos CFT. Estes autores concluíram que nenhum dos marcadores mostrou, isoladamente, sensibilidade e especificidade suficientes para o diagnóstico diferencial das lesões foliculares da tireóide.

Outro trabalho importante foi publicado por SAGGIORATO e colaboradores, utilizando um painel imunoistoquímico composto por GAL-3, CK-19, HBME-1, TPO e KS. Após avaliarem um total de 125 casos, comparando a imunocitoquímica com a imuno-histoquímica, não acharam qualquer diferença estatística, todos os marcadores (exceto TPO) foram mais expressos nos carcinomas do que nos adenomas, todos os marcadores tiveram uma associação maior com o CPT quando comparados com o CFT. Além disso, foi demonstrado que o HBME-1 teve menor acurácia nas lesões oncocíticas da tireóide, que a associação que teve maior acurácia foi GAL-3 com o HBME-1 e quando analisados os três marcadores juntos (GAL-3, CK-19 e HBME-1), a sensibilidade foi de 100%, com uma especificidade de 82%.

Portanto, o diagnóstico diferencial das lesões foliculares ainda não possui um marcador isolado capaz de distinguir o CFT do adenoma folicular. A tendência é o uso combinado de vários marcadores, pois apesar de não conseguir diferenciar sempre todas as lesões foliculares, os marcadores são úteis para o diagnóstico diferencial de casos específicos. [PRASAD *et al*, 2004]

O objetivo desse estudo foi avaliar o papel dos marcadores GAL-3, CK-19 e HBME-1 no diagnóstico diferencial das lesões foliculares em espécimes cirúrgicos do Hospital de Clínicas da UFPR no período de 1985 a 2004 e correlacionar estes resultados com o diagnóstico anátomo-patológico da peça cirúrgica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística e análise morfológica

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, através do Parecer de Aprovação número 945.175/2004-11. (Anexo 1)

Foram selecionados, através da revisão de prontuários, 45 casos de pacientes submetidos à cirurgia de tireoidectomia no Hospital de Clínicas no período de 1985 a 2004, e com diagnóstico prévio de lesão folicular através da PAAF.

Dos 45 casos previamente selecionados, foram identificadas 32 peças cirúrgicas, sendo 18 lesões malignas (13 carcinomas foliculares e 5 carcinomas papilíferos) e 14 lesões benignas (9 adenomas foliculares, 4 bócios colóides e 1 tireoidite de Hashimoto).

3.2 Avaliação morfológica e imuno-histoquímica

Para este estudo foram utilizadas as amostras de tecido tireoidiano fixadas em formalina a 10% e emblocadas em parafina, selecionados dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR.

Os cortes histológicos, corados em Hematoxilina e Eosina, representativos das lesões foram submetidos a estudo morfo-patológico por microscopia óptica, pelo mestrando e patologista co-orientador, para escolha dos blocos para procedimento imunoistoquímico e padronização dos diagnósticos (WHO 2004). (Anexo 2)

Os tumores foram então submetidos ao estudo imunoistoquímico utilizando o método de Envision e os cortes submetidos ao anticorpo primário galectina-3 (GAL-3), HBME-1 e citoqueratina-19 (CK-19).

Amostras representativas foram submetidas ao método imunoistoquímico utilizando o método do polímero (Envision, DakoCorp.), sendo os cortes submetidos às seguintes reações imuno-histoquímicas:

1. Anticorpo primário anti-galectina-3 (*Galectin-3 mouse monoclonal antibody*, Clone 25C1, Novocastra), diluição 1:100
2. Citoqueratina-19 (Cytokeratin 19, *mouse monoclonal antibody*, Clone b170, Novocastra), diluição 1:100
3. HBME-1 (*Monoclonal mouse anti-human mesothelial cell*, Clone HBME-1, DAKO Cytomation), diluição 1:50

3.2.1 Técnica Imuno-histoquímica

Foram realizados cortes em micrótomo rotatório (Spencer) das amostras em blocos de parafina, com 3.0 micrômetros de espessura, dos tecidos fixados e arquivados. Para o método imunoistoquímico foram seguidas as etapas abaixo:

- a. Desparafinação realizada com banhos de xilol
- b. Hidratação dos cortes através de série descendente de etanol (etanol absoluto, etanol 95%, etanol 70%, água destilada).
- c. Recuperação antigênica com tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 por 30 minutos em banho maria a 96 °C.
- d. Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 30% diluído em água destilada durante 7 minutos.
- e. Incubação dos cortes com o anticorpo primário, por 45 minutos na temperatura de 25 graus Celsius.
- f. Incubação pelo kit Envision por 25 minutos e lavados com PBS.

- g. Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, DAKO).
- h. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer
- i. Lâminas montadas com Bálsamo do Canadá e lamínulas de vidro.

Como controle positivo para a Galectina-3 foi utilizada reação estromal positiva em cortes de tecido prostático previamente fixados em formalina e emblocados em parafina. Para o HBME-1 foi utilizado cortes de mesotélio de apêndice vermicular e, para a CK-19, foi utilizado o epitélio escamoso maduro de mucosa lingual.

A análise dos resultados foi feita mediante uma avaliação quantitativa e qualitativa da marcação imuno-histoquímica da galectina-3, HBME-1 e citoqueratina-19, conforme o quadro abaixo: (Anexo 3).

Para avaliação dos cortes foram utilizados:

- 1) Porcentagem de células marcadas: + menos que 5%
2+ 5 a 25%
3+ 25 a 75%
4+ mais que 75%

- 2) Intensidade do marcador: + fraco
2+ moderado
3+ fortemente reativo

- 3) Distribuição: focal celular – células esparsas e isoladas
focal segmentar – grupos de células coradas
difuso

Para a realização dos cálculos estatísticos foi considerado um caso positivo aquele que apresentou uma porcentagem de células marcadas nos cortes superior a 5% ou 2+.

3.3 Análise Estatística

Para avaliar os marcadores como preditores de malignidade, foram estimados os índices de qualidade (sensibilidade, especificidade e acurácia) considerando-se o resultado da patologia como padrão ouro. Cada marcador foi avaliado individualmente e também nas combinações em paralelo. Para a comparação entre tumores malignos e benignos em relação aos resultados dos marcadores, foi usado o teste exato de Fisher. Para os intervalos de confiança, foi considerado o nível de 95% e, para os testes de hipóteses, valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4 RESULTADOS

Foram avaliadas 32 amostras de tecido tireoidiano, que foram submetidas a imuno-histoquímica para GAL-3, CK-19 e HBME-1, cujos resultados são apresentados a seguir. (Anexo 5)

4.1 Imuno-histoquímica para GAL-3

O padrão de coloração foi predominantemente citoplasmático, porém, em alguns casos o núcleo também se encontrava corado. O tecido tireoidiano normal se apresentou negativo ou focalmente reativo nas células foliculares. A maioria das lesões benignas mostrou-se negativa, porém um adenoma folicular variante oxifílica mostrou positividade moderada (5-25%) em grupos de células foliculares.

Houve uma positividade de 60% nos CPT, com 2 casos negativos, porém ambos foram fortemente positivos tanto para a CK-19 como para HBME-1. Dentre os CPT, houve somente um caso da variante folicular do CPT, o qual mostrou uma positividade difusa. Somente 1 caso de CFT foi positivo para GAL-3.

TABELA 1 – POSITIVIDADE DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA GAL-3

Diagnóstico	Nº de Casos	GAL-3 + (%)
CPT	5	3 (60%)
CFT	13	1 (7,69%)
Adenoma Folicular	9	1 (11,1%)
Bócio Colóide	4	0
Tireoidite de Hashimoto	1	0

CPT: carcinoma papilífero de tireóide; CFT: carcinoma folicular de tireóide

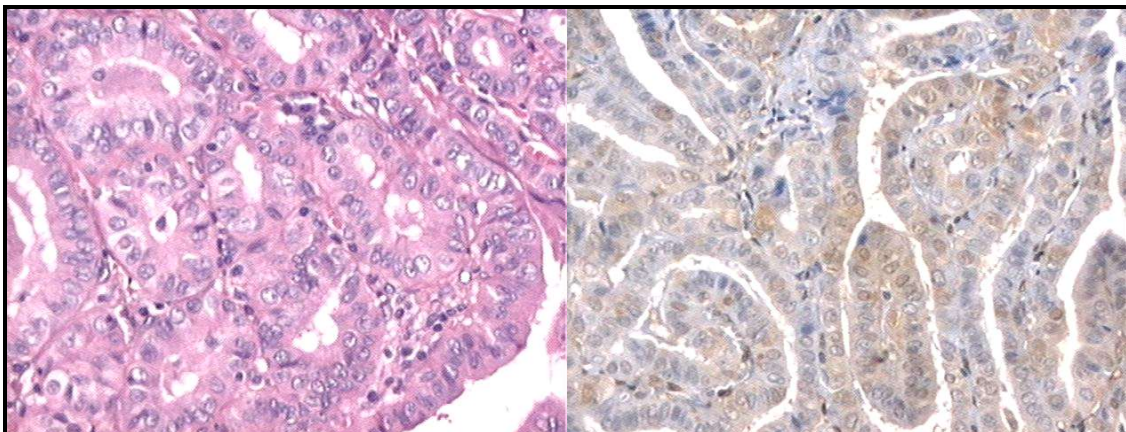
A sensibilidade para a diferenciação entre lesões benignas e malignas da tireóide foi de 22,2%, com uma especificidade de 92,86% e uma acurácia diagnóstica de 53,13%.

Quando utilizada somente a GAL-3 para diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide, foi encontrado um valor não estatisticamente significativo, com um p: 0,355.

TABELA 2 – IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA GAL-3 NOS TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DA TIREÓIDE

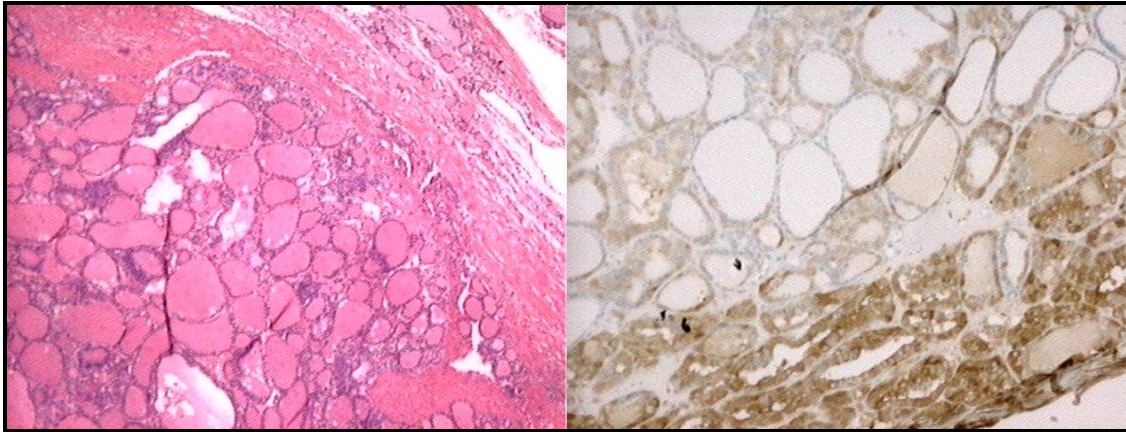
GAL-3	Patologia	
	Maligno	Benigno
Positivo	4	1
Negativo	14	13
Total	18	14

FOTOGRAFIA 1 – GAL-3 NO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE



Hematoxilina Eosina 100x/ Imuno-histoquímica para GAL-3 100x

FOTOGRAFIA 2 – GAL-3 NO CARCINOMA FOLICULAR DE TIREÓIDE



Hematoxilina Eosina 100x/ Imuno-histoquímica para GAL-3 200x

4.2 Imuno-histoquímica para CK-19

O padrão de coloração foi predominantemente pancitoplasmático. O tecido tireoidiano normal se apresentou negativo ou focalmente reativo. As lesões benignas da tireóide tiveram uma positividade variada, 1 adenoma folicular variante oxifílica foi positivo para CK-19 e, também, para GAL-3, 1 bócio colóide mostrou um padrão difuso de positividade e o único caso de tireoidite de Hashimoto mostrou-se fortemente reativo. Todos os CPT e 46,1% dos CFT foram positivos para CK-19.

TABELA 3 – POSITIVIDADE DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CK-19

Diagnóstico	Nº de Casos	CK-19 + (%)
CPT	5	5 (100%)
CFT	13	6 (46,1%)
Adenoma Folicular	9	1 (11,1%)
Bócio Colóide	4	1 (25%)
Tireoidite de Hashimoto	1	1 (100%)

CPT: carcinoma papilífero de tireóide; CFT: carcinoma folicular de tireóide

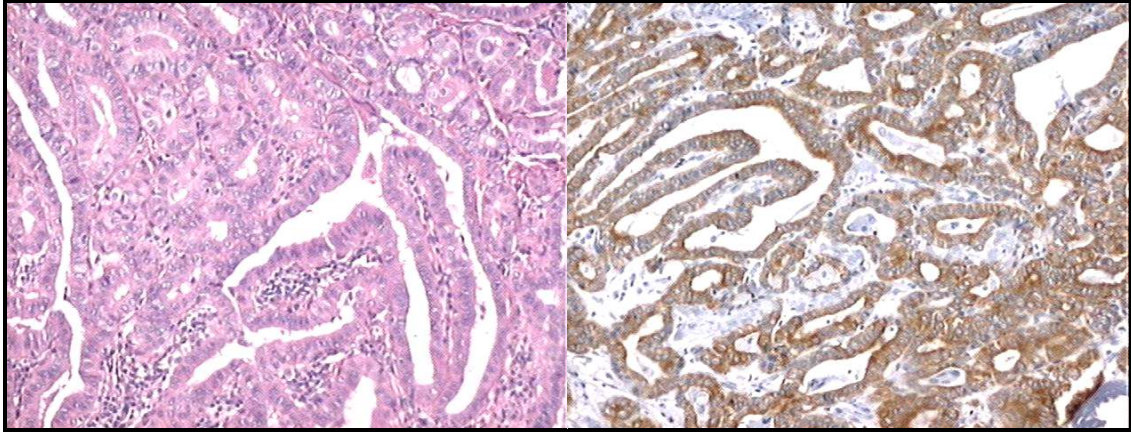
A sensibilidade para a diferenciação entre lesões benignas e malignas da tireóide foi de 61,1%, com uma especificidade de 78,6% e uma acurácia diagnóstica de 68,8%.

Quando utilizado somente a CK-19 para diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide, foi encontrado um valor estatisticamente significativo, com um p: 0,036.

TABELA 4 – IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CK-19 NOS TUMORES MALIGNOS E BENIGNOS DA TIREÓIDE

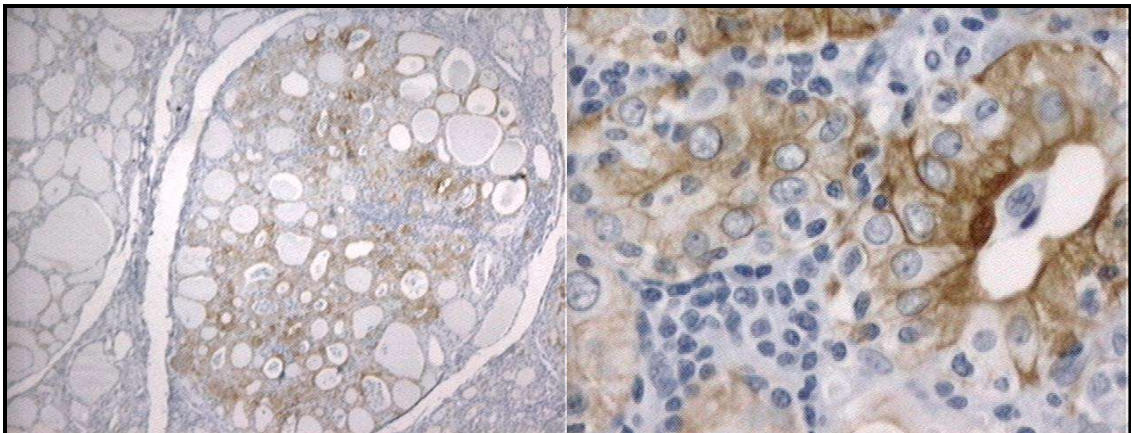
CK-19	Patologia	
	Maligno	Benigno
Positivo	11	3
Negativo	7	11
Total	18	14

FOTOGRAFIA 3 – CK-19 NO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE



Hematoxilina Eosina 100x/ Imuno-histoquímica para CK-19 100x

FOTOGRAFIA 4 – CK-19 NA TIREOIDITE HASHIMOTO



Imuno-histoquímica para CK-19 40x/ Imuno-histoquímica para CK-19 400x

4.3 Imuno-histoquímica para HBME-1

O padrão de coloração foi principalmente citoplasmático e nas membranas celulares. O tecido tireoidiano normal se apresentou negativo ou focalmente reativo. Entre as lesões benignas, todos os adenomas foliculares foram negativos, porém 50% dos bócios colóide foram positivos para o HBME-1, corando de 25 a 75% das células foliculares.

Nas lesões malignas houve uma positividade de 100% nos CPT e de 23,1% nos carcinomas foliculares da tireóide. Os 3 casos de CFT variante oxifílica foram negativos para o HBME-1.

TABELA 5 – POSITIVIDADE DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA HBME-1

Diagnóstico	Nº de Casos	HBME-1 + (%)
CPT	5	5 (100%)
CFT	13	3 (23,1%)
Adenoma Folicular	9	0
Bócio Colóide	4	2 (50%)
Tireoidite de Hashimoto	1	0

CPT: carcinoma papilífero de tireóide; CFT: carcinoma folicular de tireóide

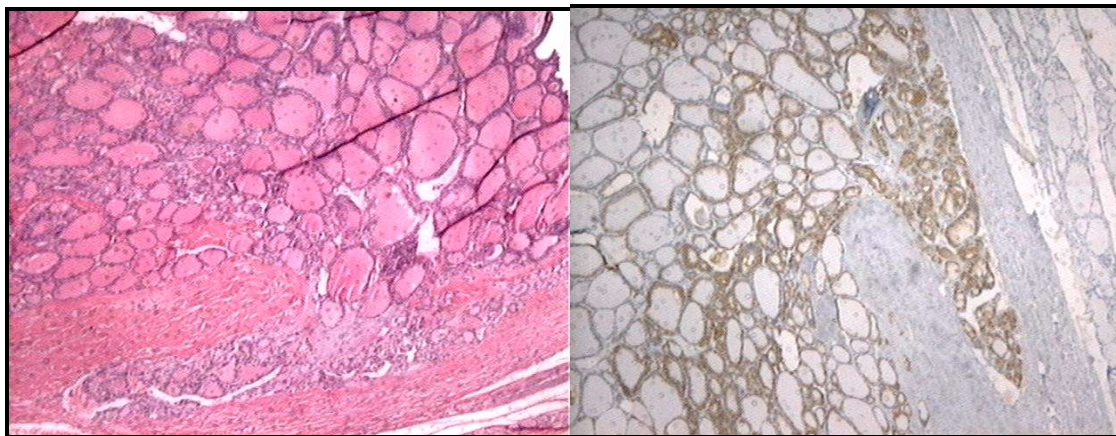
A sensibilidade para a diferenciação entre lesões benignas e malignas da tireóide foi de 44,4%, com uma especificidade de 85,7% e uma acurácia diagnóstica de 62,5%.

Quando utilizado somente o HBME-1 para diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide, foi encontrado um valor estatisticamente não significativo, com um p: 0,124.

TABELA 6 – IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA HBME-1 NOS TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DA TIREÓIDE

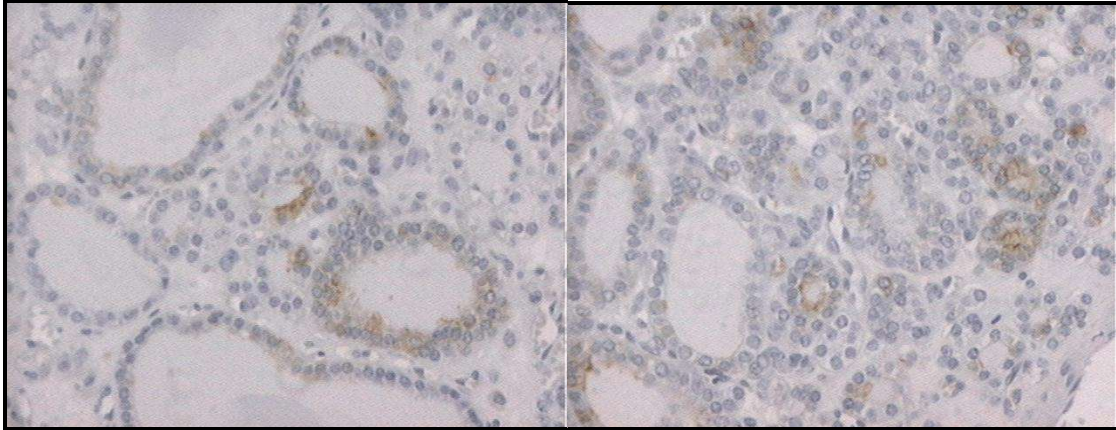
HBME-1	Patologia	
	Maligno	Benigno
Positivo	8	2
Negativo	10	12
Total	18	14

FOTOGRAFIA 5 – HBME-1 NO CARCINOMA FOLICULAR DA TIREÓIDE



Hematoxilina Eosina 100x/ Imuno-histoquímica para HBME-1 40x

FOTOGRAFIA 6 – HBME-1 NO BÓCIO COLÓIDE



Imuno-histoquímica para HBME-1 100x/Imuno-histoquímica para HBME-1 200x

4.4 Imuno-histoquímica para GAL-3 e CK-19

A análise conjunta dos marcadores GAL-3 e CK-19 revelou uma sensibilidade de 66,7%, com uma especificidade de 78,6% e uma acurácia diagnóstica de 71,9%.

Quando utilizamos os dois marcadores para diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide, foi encontrado um valor estatisticamente significativo, com um p : 0,016.

TABELA 7 – IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA GAL-3 E CK-19 NOS TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DA TIREÓIDE

GAL-3 e CK-19	Patologia	
	Maligno	Benigno
Positivo em pelo menos um dos marcadores	12	3
Negativo nos dois marcadores	6	11
Total	18	14

4.5 Imuno-histoquímica para GAL-3 e HBME-1

A análise conjunta dos marcadores GAL-3 e HBME-1 revelou uma sensibilidade de 50,0%, com uma especificidade de 78,6% e uma acurácia diagnóstica de 62,5%.

Quando utilizamos os dois marcadores para diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide, foi encontrado um valor estatisticamente não significativo, com um p: 0,147.

TABELA 8 – IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA GAL-3 E HBME-1 NOS TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DA TIREÓIDE

GAL-3 e HBME-1	Patologia	
	Maligno	Benigno
Positivo em pelo menos um dos marcadores	9	3
Negativo nos dois marcadores	9	11
Total	18	14

4.6 Imuno-histoquímica para CK-19 e HBME-1

A análise conjunta dos marcadores CK-19 e HBME-1 revelou uma sensibilidade de 61,1%, com uma especificidade de 71,4% e uma acurácia diagnóstica de 65,6%.

Quando utilizamos os dois marcadores para diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide, foi encontrado um valor estatisticamente não significativo, com um p: 0,087.

TABELA 9 – IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CK-19 E HBME-1 NOS TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DA TIREÓIDE

CK-19 e HBME-1	Patologia	
	Maligno	Benigno
Positivo em pelo menos um dos marcadores	11	4
Negativo nos dois marcadores	7	10
Total	18	14

4.7 Imuno-histoquímica para GAL-3, CK-19 e HBME-1

A análise conjunta dos marcadores GAL-3, CK-19 e HBME-1 revelou uma sensibilidade de 66,7%, com uma especificidade de 71,4% e uma acurácia diagnóstica de 68,8%.

Quando utilizamos os três marcadores para diferenciação entre tumores benignos e malignos da tireóide, foi encontrado um valor estatisticamente não significativo, com um p: 0,073.

TABELA 10 – IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA GAL-3, CK-19 E HBME-1 NOS TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DA TIREÓIDE

GAL-3, CK-19 e HBME-1	Patologia	
	Maligno	Benigno
Positivo em pelo menos um dos marcadores	12	4
Negativo nos dois marcadores	6	10
Total	18	14

5 DISCUSSÃO

A punção aspirativa com agulha fina (PAAF) é uma técnica diagnóstica bem estabelecida na investigação pré-operatória de nódulos tireoidianos, permitindo uma diminuição significativa no número de procedimentos cirúrgicos da tireóide. [NASSER *et al*, 2000] Porém, uma importante limitação da PAAF é a falta de sensibilidade na avaliação de neoplasias foliculares devido a sua incapacidade em diferenciar lesões foliculares benignas das lesões foliculares malignas da tireóide. [SAGGIORATO *et al*, 2001]

Este estudo foi feito partindo dos casos que tiveram diagnóstico inicial de lesão folicular pela PAAF e mostrou que dos 18 casos de carcinoma, 72% tiveram o diagnóstico de CFT. Este achado não concorda com os estudos prévios, que mostram que a maioria dos carcinomas diagnosticados como lesão folicular correspondem ao CPT. [DEVECI *et al*, 2006] Este fato pode estar associado à dificuldade de obtenção de material para o estudo, pois dos 45 casos previamente selecionados, somente 32 tiveram material suficiente e adequado.

A dificuldade na diferenciação das lesões foliculares pela PAAF levou à investigação de vários marcadores moleculares, que pudessem de uma maneira confiável distinguir entre as lesões malignas e benignas da tireóide. Entre estes, os que mais se destacaram foram a GAL-3, o HBME-1 e a CK-19. [MEHROTRA *et al*, 2004; SAGGIORATO *et al*, 2005; CERUTTI *et al*, 2006]

Deve-se ressaltar que neste estudo, para a expressão dos marcadores selecionados (GAL-3, CK-19 e HBME-1) através da imuno-histoquímica, foram utilizados anticorpos monoclonais espécie específicos e um sistema de detecção livre de biotina, com a finalidade de impedir a interferência de fatores técnicos, como a reatividade cruzada com antígenos inespecíficos e a atividade endógena da biotina. [HERRMAN *et al*, 2002; BARTOLAZZI *et al*, 2003; SAGGIORATO *et al*, 2004] Esses problemas técnicos podem ser os responsáveis pela maior parte das discrepâncias existentes em outros estudos, particularmente, envolvendo a GAL-3 e o HBME-1. [NASCIMENTO *et al*, 2001; MAI *et al*, 2002; MEHROTRA *et al*, 2004]

Os estudos com imuno-histoquímica mostram que a GAL-3 é significativamente mais expressa no CFT do que no adenoma folicular. [ORLANDI *et al*, 1998; GASBARRI *et al*, 1999; BARTOLAZZI *et al*, 2001] O trabalho mais importante foi feito por BARTOLAZZI e colaboradores, que mostraram uma sensibilidade de 94% com uma especificidade de 98% na discriminação entre lesões tireoidianas benignas e malignas. Porém, MEHROTRA e colaboradores em outro estudo demonstraram que a GAL-3 foi mais expressa nos adenomas foliculares em relação aos CFT. Além disso, mostrou uma expressão da galectina-3 em 57% dos bócios multinodulares, questionando a sua utilidade como marcador de malignidade para a tireóide.

Nosso estudo mostrou que a GAL-3 teve uma sensibilidade de 22,2% com uma especificidade de 92,86% no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas da tireóide, com uma acurácia diagnóstica de 53,1%. Além disso, não houve uma diferença significativa quando utilizado somente a GAL-3 nesta diferenciação ($p = 0.355$). Estes resultados concordam com o estudo de MEHROTRA e colaboradores, corroborando com a ineficácia da GAL-3 como um marcador isolado na diferenciação das lesões foliculares da tireóide.

Por outro lado, a GAL-3 teve uma maior positividade nos CPT, fato que concorda com a maioria dos estudos já realizados com esse marcador. [GASBARRI *et al*, 1999; BARTOLAZZI *et al*, 2001; BEESLEY *et al*, 2002]

Outro dado revelado por nosso estudo foi a expressão da GAL-3 em 11,1% dos adenomas foliculares. Outros estudos já mostraram que os adenomas podem expressar a GAL-3. [ORLANDI *et al*, 1998, CVEJIC *et al*, 1998] A positividade da GAL-3 nos adenomas foliculares foi sugerida por diversos autores como uma indicação de transformação maligna incipiente. [SAGGIORATO *et al*, 2001; COLI *et al*, 2002; VOLANTE *et al*, 2004]

Outro marcador bastante utilizado na diferenciação das lesões foliculares é a CK-19, que tem um grande valor na identificação do CPT em todos os seus tipos histológicos. [RAPHAEL *et al*, 1994; FONSECA *et al*, 1997; CHEUNG *et al*, 2001] FONSECA e colaboradores mostraram que a CK-19 é expressa fracamente no tecido tireoidiano normal e DOCKHORN-DWORNICZAK e colaboradores

mostraram um padrão focal de expressão nos adenomas foliculares e nos bócios multinodulares.

Nosso estudo mostrou que a CK-19 teve uma sensibilidade de 61,1% com uma especificidade de 78,6% na diferenciação entre lesões benignas e malignas da tireóide. Além disso, mostrou uma expressão em 100% dos CPT, concordando com os dados existentes na literatura. [CHEUNG *et al*, 2001]

Os resultados dos estudos prévios da imuno-reatividade da CK-19 no carcinoma folicular são bastante variados, podendo estar entre 0 e 100% dos casos. [RAPHAEL *et al*, 1994; MIETTINEN *et al*, 1996; CHEUNG *et al*, 2001] Nosso estudo mostrou uma expressão da CK-19 em 46,1% dos carcinomas foliculares da tireóide.

A CK-19 mostrou-se positiva em 11,1% dos adenomas foliculares avaliados, em 25% dos bócios multinodulares e no caso isolado da tireoidite de Hashimoto. SAHOO e colaboradores realizaram um estudo que mostrou uma positividade forte em 25% dos 20 adenomas foliculares analisados, demonstrando que a presença de uma reação positiva para CK-19, de forma isolada, não pode ser utilizada para estabelecer um diagnóstico de malignidade.

Um dado interessante mostrado em nosso estudo foi que a CK-19 foi o único marcador significativamente mais expresso nos carcinomas do que nas lesões benignas da tireóide ($p = 0.036$), tendo um desempenho melhor que a galectina-3 e o HBME-1 tanto nos CPT como nos CFT.

O HBME-1 é um anticorpo monoclonal que reage contra um antígeno desconhecido nos microvilos da superfícies das células mesoteliais. [SHEIBANI *et al*, 1992] Na maioria dos estudos com HBME-1 existe uma expressão maior nos CPT e CFT, mas não nas células tireoidianas normais. [CASEY *et al*, 2003] CHEUNG e colaboradores demonstraram uma imuno-reatividade de 54% das lesões malignas derivadas do epitélio folicular e todas as lesões benignas foram negativas. Rossi e colaboradores avaliaram 100 lesões tireoidianas, sendo 42 lesões malignas e 58 lesões benignas e o HBME-1 mostrou uma sensibilidade de 92,8% e uma especificidade de 98,2% no diagnóstico das lesões malignas da tireóide. [MASE *et al*, 2003]

Nosso estudo mostrou que o HBME-1 teve uma sensibilidade de 44,4% com uma especificidade de 85,7% no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas da tireóide. Outro dado apresentado foi que 100% dos CPT foram positivos para esse marcador, contrastando com apenas 23,1% de positividade nos CFT da tireóide.

Em relação aos CFT, deve-se ressaltar que nossa casuística tinha 3 casos de carcinoma folicular variante oxifílica e todos eles foram negativos para o HBME-1, concordando com as evidências da literatura que mostram que as células oxifílicas diminuem a expressão do HBME-1. [MAI *et al*, 2002]

Quando os dados foram analisados em conjunto, observou-se que a utilização conjunta da GAL-3 com o CK-19 foi a que teve a melhor sensibilidade (66,7%), especificidade (78,6%) e acurácia diagnóstica (71,9%) e a combinação de GAL-3 com HBME-1 foi a pior combinação com uma sensibilidade de 50,0%, especificidade de 78,6% e acurácia de 62,5%. Além disso, quando os três marcadores foram utilizados em conjunto a sensibilidade foi de 66,7% com uma especificidade de 71,4% dos casos e uma acurácia diagnóstica de 68,8%.

A utilização conjunta de GAL-3 com CK-19 foi a única combinação que mostrou significância estatística na diferenciação entre lesões benignas e malignas da tireóide ($p = 0.016$).

SAGGIORATO e colaboradores fizeram um estudo com 125 peças cirúrgicas, as quais tiveram diagnóstico de lesão folicular através da PAAF, submetidas a imuno-histoquímica para a GAL-3, CK-19, HBME-1, além de tiroperoxidase (TPO) e keratan-sulfato (KS). Estes autores demonstraram que utilizando os mesmos três marcadores do nosso estudo, a sensibilidade foi de 100%, porém com especificidade de 82% na diferenciação entre lesões benignas e malignas da tireóide. Além disso, mostraram que a combinação de GAL-3 com HBME-1 foi melhor para lesões não-oncocíticas (sensibilidade de 97%, especificidade de 95%) e a combinação de GAL-3 com CK-19 foi a melhor nas lesões oncocíticas da tireóide (sensibilidade e especificidade de 100%).

Podemos concluir que os marcadores, quando utilizados isoladamente, não apresentam sensibilidade e especificidade suficientes para o diagnóstico

diferencial entre lesões benignas e malignas da tireóide. Entretanto, a combinação entre os três marcadores pode ser de grande utilidade nessa diferenciação.

Vale ressaltar que a busca de marcadores mais sensíveis e específicos para o diagnóstico diferencial das lesões foliculares continua, destacando-se novos marcadores como o DDIT3, ARG2, ITM1 e C1orf24, que mostraram resultados promissores em um estudo realizado por CERUTTI e colaboradores. [CERUTTI *et al*, 2006]

6 CONCLUSÕES

I. A CK-19 foi o único marcador imunoistoquímico, quando utilizado de forma isolada, que teve significância para o diagnóstico diferencial das lesões foliculares da tireóide. A GAL-3 e o HBME-1, quando utilizados isoladamente, não tiveram sensibilidade e especificidade suficientes.

II. O uso de um painel imunoistoquímico melhorou a sensibilidade e especificidade do diagnóstico diferencial das lesões foliculares da tireóide. A melhor associação entre os marcadores utilizados, foi a GAL-3 com a CK-19.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V.A.F., BACCHI, C.E., VASSALO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

ASA, S.L. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. **Endocrine Pathology**, v. 16, p. 295-310, 2005.

BACCHI, C.E., ALMEIDA, P.C.C., FRANCO, M. **Manual de Padronização de laudos histopatológicos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 2005.

BARTOLAZZI, A., GASBARRI, A., PAPOTTI, M. et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. **Lancet**, v. 357, p. 1644-1650, 2001.

BARTOLAZZI, A., PAPOTTI, M., ORLANDI, F. Methodological considerations regarding the use of galectin-3 expression analysis in preoperative evaluation of thyroid nodules. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, p. 951, 2003.

BEESELEY, M.F., MCLAREN, K.M. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. **Histopathology**, v. 41, p. 236-243, 2002.

BERNET, V.J., ANDERSON, J., VAISHNAV, Y. et al. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 4792-4796, 2002.

BERTHO, M., SUSTER, S. Clear nuclear changes in Hashimoto's thyroiditis. A clinicopathologic study of 12 cases. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 25, p. 513-521, 1995.

CALICIFE S., CASTRONOVO, V., VAN DEN BRÜLE, F. Galectin-3 and cancer. **International Journal of Oncology**, v. 25, p. 983-992, 2004.

CASEY, M.B., LOHSE, C.M., LLOYD, R.V. Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3 and HBME-1. **Endocrine Pathology**, v. 14, p. 55-60, 2003.

CERUTTI, J.M., LATINI, F.R., NAKABASHI, C., et al. Diagnosis of suspicious thyroid nodules using four protein biomarkers. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 3311-3318, 2006.

COLI, A., BIGOTTI, G., ZUCCHETTI, F. et al. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. **Histopathology**, v. 40, p. 80-87, 2002.

CHEUNG, C.C., EZZAT, S., FREEMAN, J.L. et al. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. **Modern Pathology**, v. 14, p. 338-342, 2001.

CVEJIC, D., SAVIN, S., PAUNOVIC, I. et al. Immunohistochemical localization of galectin-3 in malignant and benign human thyroid tissue. **Anticancer Research**, v. 18, p. 2637-2641, 1998.

DEVECI, M.S., DEVECI, G., LIVOLSI, V.A., et al. Fine-needle aspiration of follicular lesions of the thyroid. Diagnosis and follow-up. **Cytojournal**, v. 3, p. 1-5, 2006.

DOCKHORN-DWORNICZAK, B., FRANKE, W.W., SCHRÖDER, S., et al. Patterns of expression of cytoskeletal proteins in human thyroid gland and thyroid carcinomas. **Differentiation**, v. 35, p. 53-71, 1987.

ESPINOSA, A.V., PORCHIA, L., RINGEL, M.D. Targeting BRAF in thyroid cancer. **British Journal of Cancer**, v. 96, p. 16-20, 2007.

FAGGIANO, A., CAILLOU, B., LACROIX, L., et al. Functional characterization of human thyroid tissue with immunohistochemistry. **Thyroid**, v. 17, p. 203-211, 2007.

FONSECA, E. NESLAND, J.M., SOBRINHO-SIMÕES, M. Pattern of expression of intermediate cytokeratin filaments in the thyroid gland: and immunohistochemical study of simple and stratified epithelial-type cytokeratins. **Virchows Archives**, v. 430, 239-245, 1997.

GASBARRI, A., MARTEGANI, M.P., DEL PRETE, F., et al. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, p. 3494-3502, 1999.

GASBARRI, A., MARCHETTI, C., IERVASI, G. et al. From the bench to the bedside. Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid nodules. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 356-359, 2004.

GHARIB, H., GOELLNER, J.R., JOHNSON, D.A. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid. A 12-year experience with 11000 biopsies. **Clin Lab Med**, v. 13, p. 699-709, 1993.

GIANINNI, R., UGOLINI, C., LUPI, C et al. The heterogeneous distribution of BRAF mutation supports the independent clonal origin of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2007, in press.

HAMBURGER, J.I. Diagnosis of thyroid nodules by fine needle biopsy: use and abuse. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 79, p. 335-339, 1994.

HERMANN, M.E., LIVOLSI, V.A., PASHA, T.L., et al. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. **Archives of Pathology Laboratory of Medicine**, v. 126, p. 710-713, 2002.

JOHANNESSEN, J.V., SOBRINHO-SIMÕES, M. The origin and significance of thyroid psammoma bodies. **Laboratory Investigation**, v. 43, p. 287-296, 1980.

LIVOLSI V.A, BALOCH, Z.W. Follicular neoplasms of the thyroid. View, biases and experiences. **Advances in anatomic pathology**, v. 11, p. 279-287, 2004.

KIMURA, E.T., NIKIFOROVA, M.N., ZHU, Z. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence of constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Research**, v. 63, p. 1454-1457, 2003.

MAI, K.T., BOKHARY, R., YAZDI, H.M., et al. Reduced HBME-1 immunoreactivity of papillary thyroid carcinoma and papillary thyroid carcinoma-related neoplastic lesions with Hürthle cell and/or apocrine-like changes. **Histopathology**, v. 40, p. 133-142, 2002.

MARTINS L., MATSUO S.E., EBINA, K.N. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. **The Journal of Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 4806-4810, 2002.

MASE, T., FUNAHASHI, H., KOSHIKAWA, T., et al. HBME-1 immunostaining in thyroid tumors especially in follicular neoplasm. **Endocrine Journal**, v. 50, p. 173-177, 2003.

MATOS, P.S., FERREIRA, A.P., DE OLIVEIRA FACURI, F. et al. Usefulness of HBME-1, cytokeratin-19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. **Histopathology**, v. 47, p. 391-401, 2005.

MEHROTRA, P., OKPOKAM, A, BOUHAI DAR, R., et al. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. **Hystopathology**, v. 45, p. 493-500, 2004.

MIETTINE, M., KÄRKKÄINEN, P. Differential reactivity of HBME-1 and CD15 antibodies in benign and malignant thyroid tumours. **Virchows Archives**, v. 429, p. 213-219, 1996.

NASSER, S.M., PITMAN, M.B., PILCH, B.Z., et al. Fine-needle aspiration biopsy of papillary thyroid carcinoma. Diagnostic utility of cytokeratin 19 immunostaining. **Cancer**, v. 90, p. 307-311, 2000.

NASCIMENTO, M.C., BISI, H., ALVES, V.A., et al.. Differential reactivity for galectin-3 in Hürthle cell adenomas and carcinomas. **Endocrine Pathology**, v. 12, 275-279, 2001.

NIEDZIELA, M., MACELUCH, J., KORMAN, E. Galectin-3 is not an universal marker of malignancy in thyroid nodular disease in children and adolescents. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabologism**, v. 87, p. 4411-4415, 2002.

NIKIFOROVA, M.N., LYNCH, R.A., BIDDINGER, P.W., et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: Evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, p. 2318-2326, 2003.

ORLANDI F., SAGGIORATO E., PIVANO G., et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. **Cancer Res**, v. 58, p. 3015-3020, 1998.

PRASAD, M.L., PELLEGGATA, N.S., HUANG, Y. Et al. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. **Modern Pathology**, p. 1-10, 2004.

PRASAD, M.L, HUANG, Y., PELLEGGATA, N.S. et al. Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma (PTC)-like nuclear alterations express molecular markers of PTC. **Histopathology**, v. 45, p. 39-46, 2004.

RAPHAEL, S.J., McKEOWN-EYSEN, G., ASA, S.L. High-molecular-weight cytokeratins and cytokeratin-19 in the diagnosis of thyroid tumors. **Modern Pathology**, v. 7, p. 295-300, 1994.

ROSAI, J., CARCANGIU, M.L., DeLELLIS, R.A. **Tumors of the thyroid gland**. Bethesda: Armed Forces Institute of Pathology, 1992.

ROSSI, E.D., RAFFAELLI, M., MULE, A., et al. Simultaneous immunohistochemical expression of HBME-1 and galectin-3 differentiates papillary carcinomas from hyperfunctioning lesions of the thyroid. **Histopathology**, v. 48, p. 795-800, 2006.

SAGGIORATO, E., CAPPIA, S., DE GIULI, P. et al. Galectin-3 as a presurgical immunocyodiagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. **The Journal of Endocrinology & Metabology**, v. 86, p. 5152-5158, 2001.

SAGGIORATO, E., AVERSA, S., DEANDREIS, D., et al. Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 27, p. 311-317, 2004.

SAGGIORATO, E., DePOMPA, R., VOLANTE, M., et al. Characterization of thyroid "follicular neoplasms" in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, p. 305-317, 2005.

SAHOO, S., HODA, S.A., ROSAI, J., et al. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. A note of caution. **Anatomic Pathology**, v. 116, p. 696-702, 2001.

SOBRINHO-SIMÕES, M., PRETO, A., ROCHA, A.S., et al. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. **Virchows Archives**, v. 447, p. 787-793, 2005.

SHEIBANI, K. ESTEBAN, J.M., BAILEY, A., et al. Immunopathologic and molecular studies as an aid to the diagnosis of malignant mesothelioma. **Human Pathology**, v. 23, p. 107-116, 1992.

STEWART, B.W., KLEIHUES, P. **World Cancer Report**. Lyon: IARC Press, 2003.

TAKANO, T., MIYAUCHI, A., MATSUZUKA, F., et al. Ubiquitous expression of galectin-3 mRNA in benign and malignant thyroid tumors. **Cancer Letters**, v. 199, p. 69-73, 2003.

TAMIMI, D.M. The association between chronic lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors. **Internation Journal of Surgical Pathology**, v. 10, p. 141-146, 2002.

VOLANTE M., BOZZALLA-CASSIONE, F., ORLANDI, F. et al. Diagnostic role of galectin-3 in follicular thyroid tumors. **Virchows Archives**, v. 444, p. 309-312, 2004.

VOLANTE, M., BOZZALLA-CASSIONE, F., DEPOMPA, R. Et al. Galectin-3 and HBME-1 expression in oncocytic cell tumors of the thyroid. **Virchows Archives**, v. 445, p. 183-188, 2004.

XU X.C., EL-NAGGAR, A K., LOTAN, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors: potential diagnostic implications. **American Journal of Pathology**, v. 147, p. 815-822, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION OF TUMOURS. Em: DeLellis, R.A., Lloyd, R.V., Heitz, P.U., Eng, C. (Eds), **Pathology and Genetics. Tumours of Endocrine Organs**. Lyon: IARC Press, 2004, p. 49-72.

**ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR.**



Curitiba, 20 de janeiro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dr. Cássio Slompo Ramos
Nesta

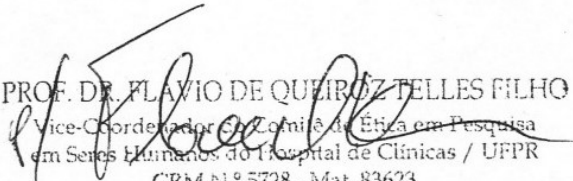
Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “ANÁLISE DO USO DA GALECTINA NO DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DAS LESÕES FOLICULARES”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 30 de novembro de 2004 . O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.
Protocolo CEP/HC 945.175/2004-11

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 20 de julho de 2005.

Atenciosamente,


PROF. DR. FLAVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas / UFPR
CRM N.º 5728 - Mat. 83623

Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

**ANEXO 2 - PLANILHA UTILIZADA NA REVISÃO HISTOLÓGICA DAS
LÂMINAS**

**ANEXO 3 – PLANILHA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DAS LÂMINAS**

Anexo 3 – Imuno-histoquímica

Caso no.:	IMUNO-HISTOQUÍMICA					
	Galectina-3		HBME-1		CK19	
	TUMOR	FORA	TUMOR	FORA	TUMOR	FORA
Proporção						
Intensidade						
Distribuição						

Observações:

**ANEXO 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES TIREOIDIANOS
SEGUNDO “*WORLD HEALTH ORGANIZATION*”**

Classificação da “World Health Organization” (WHO) dos tumores tireoidianos

Carcinomas da Tireóide	Outros Tumores da Tireóide
Carcinoma Papilífero	Teratoma
Carcinoma Folicular	Linfoma primário e Plasmocitoma
Carcinoma Pouco Diferenciado	Timoma Ectópico
Carcinoma Indiferenciado (Anaplásico)	Angiosarcoma
Carcinoma de Células Escamosas	Tumores de Músculo Liso
Carcinoma Mucoepidermóide	Tumores de Nervo Periférico
Carcinoma Mucoepidermóide Esclerosante com Eosinofilia	Paraganglioma
Carcinoma Mucinoso	Tumores Fibrosos Solitários
Carcinoma Medular	Tumores de células dendríticas foliculares
Carcinoma Misto Medular e Folicular	Histiocitose de células de Langerhans
Tumor de células espinhosas com diferenciação “timus-like”	Tumores Secundários
Carcinoma mostrando diferenciação “timus-like”	
Adenoma da Tireóide e Tumores Relacionados	
Adenoma Folicular	
Tumor Trabecular Hialinizante	

**ANEXO 5 – DADOS INDIVIDUAIS DOS MARCADORES IMUNO-
HISTOQUÍMICOS**

Diagnóstico	GAL-3	CK-19	HBME-1
Carcinoma folicular	negativo	P2+/I2+/Fs	P2+/I3+/Fs
Carcinoma folicular	negativo	negativo	negativo
Carcinoma folicular	negativo	P2+/I3+/Fs	P+/I2+/Fc
Carcinoma folicular	negativo	P+/I3+/Fs	negativo
Carcinoma folicular	negativo	P3+/I3+/Fs	P3+/I3+/D
Carcinoma folicular	negativo	negativo	negativo
Carcinoma folicular	negativo	P2+/I3+/Fs	negativo
Carcinoma folicular	negativo	P+/I+/Fc	negativo
Carcinoma folicular	P+/I2+/Fc	P3+/I3+/D	P3+/I3+/D
Carcinoma folicular	P3+/I2+/Fs	negativo	P+/I2+/Fs
Carcinoma folicular variante oxifilica	negativo	negativo	P+/I2+/Fc
Carcinoma folicular variante oxifilica	P+/I3+/Fs	P2+/I3+/Fs	P+/I2+/Fc
Carcinoma folicular variante oxifilica	P+/I2+/Fs	P+/I2+/Fc	negativo
Carcinoma papilífero	P+/I3+/Fs	P4+/I3+/D	P4+/I3+/D
Carcinoma papilífero	P3+/I3+/D	P4+/I3+/D	P4+/I3+/D
Carcinoma papilífero	negativo	P3+/I3+/Fs	P4+/I3+/D
Carcinoma papilífero	P3+/I3+/Fs	P4+/I3+/D	P4+/I3+/D
Carcinoma papilífero variante folicular	P4+/I3+/D	P4+/I3+/D	P4+/I3+/D
Adenoma folicular	negativo	P+/I2+/Fs	negativo
Adenoma folicular	negativo	P+/I3+/Fs	P+/I3+/Fs
Adenoma folicular	negativo	P+/I2+/Fs	P+/I+/Fc
Adenoma folicular	negativo	negativo	P+/I2+/Fc
Adenoma folicular variante oxifilica	negativo	negativo	negativo
Adenoma folicular variante oxifilica	negativo	P+/I3+/Fs	negativo
Adenoma folicular variante oxifilica	negativo	negativo	negativo
Adenoma folicular variante oxifilica	P2+/I3+/Fs	P2+/I+/Fs	negativo
Adenoma folicular variante oxifilica	negativo	negativo	negativo
Bócio colóide	negativo	negativo	P3+/I3+/Fs
Bócio colóide	negativo	P+/I2+/Fc	negativo
Bócio colóide	negativo	negativo	negativo
Bócio colóide	negativo	P3+/I2+/D	P3+/I2+/Fs
Tireoidite de Hashimoto	negativo	P2+/I3+/Fs	negativo

Legenda:**Proporção (P)**

+ < 5%

++ 5 – 25%

+++ 25-75%

++++ > 75%

Intensidade (I)

+ fraco

++ moderado

+++ forte

Distribuição

Focal celular (Fc)

Focal segmentar (Fs)

Difuso (D)