

**Sílvia E. Matsuo
Luciane Martins
Suzana G. Leoni
Denise Hajjar
Júlio César M. Ricarte-Filho
Kátia N. Ebina
Edna T. Kimura**

*Departamento de Histologia &
Embriologia, Instituto de Ciências
Biomédicas, Universidade de São
Paulo, São Paulo, SP.*

RESUMO

Um marcador biológico ideal deve ser específico e sensível para identificar o tipo tumoral e caracterizar o estágio da progressão neoplásica. Os tumores de tireóide originam-se de dois tipos celulares: 1) carcinoma medular originário de células parafoliculares; e 2) as neoplasias de células epiteliais foliculares, que incluem bócio, adenomas, carcinomas diferenciados (carcinoma papilífero e carcinoma folicular) e carcinoma indiferenciado (carcinoma anaplásico). O comportamento biológico distinto faz com que cada tipo tumoral necessite de uma conduta terapêutica específica. O conhecimento acumulado ao longo destes anos, utilizando métodos de biologia molecular e, mais recentemente, a genômica, identificou mutações específicas de câncer de tireóide e, atualmente, entendemos muito das alterações que ocorrem na expressão de fatores de crescimento, seus receptores e proteínas sinalizadoras intracelular nas neoplasias tiroidianas. Contudo, apesar desses, até o momento não dispomos de um marcador eficiente que auxilie no diagnóstico e prognóstico e, conseqüentemente, para indicação de uma terapêutica mais adequada. Nesta revisão, discutiremos os principais aspectos relacionados à tumorigênese tiroidiana, avaliando o potencial destes fatores como marcador em neoplasia folicular de tireóide. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/1:114-125)

Descritores: Marcador biológico; Tireóide; Tumores de tireóide; Câncer de tireóide; Tumorigênese

ABSTRACT

Biological Markers in Thyroid Tumors.

Thyroid tumors originate from two cell types: 1) medullar carcinoma from parafollicular cells and 2) the tumors derived from follicular epithelial cells, which include multinodular goiter, adenomas, differentiated carcinomas (papillary and follicular carcinoma) and undifferentiated carcinoma (anaplastic carcinoma). Because of the tumors distinct biological behavior, there is a requirement for a specific therapeutic approach. Some thyroid cancer specific mutations have been identified using molecular biology and more recently, genomic methodology. We now understand much of the alterations that occur in the expression of growth factors, receptors and the intracellular signaling pathway. However, none of these have yet proven to be efficient as a marker for diagnosis and prognosis, nor are they helpful in establishing a targeted therapeutic approach. In this review, we will discuss the main aspects of thyroid tumorigenesis and evaluate the potential of these factors as markers for thyroid follicular neoplasia. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/1:114-125)

Keywords: Biological markers; Thyroid; Thyroid tumors; Thyroid cancer; Tumorigenesis

*Recebido em 17/10/03
Aceito em 30/10/03*

A GLÂNDULA TIRÓIDE ESTÁ SOB O CONTROLE da tireotropina hipofisária (TSH) e do iodo, os quais regulam sua função e proliferação. A tireóide adulta caracteriza-se pela baixa renovação de suas células foliculares; entretanto, mantém o potencial para proliferar em resposta a estímulos. A incidência do nódulo tireoidiano palpável, na população geral, é de cerca de 4 a 7%, contudo, com o advento da ultra-sonografia, a prevalência sobe para 30%, mostrando uma alta capacidade mitogênica do tecido. Os nódulos são, em sua grande maioria, lesões benignas que incluem bócio colóide e os adenomas foliculares atóxico e tóxico, enquanto uma pequena porção corresponde ao câncer. Os carcinomas de tireóide se originam de dois tipos celulares: carcinoma medular originário de células parafoliculares e as neoplasias de células epiteliais foliculares. Dentre as neoplasias foliculares malignas, mais de 90% são carcinomas diferenciados papilíferos e carcinomas foliculares, e cerca de 1% corresponde ao carcinoma indiferenciado ou anaplásico, a neoplasia folicular mais agressiva da tireóide. Os adenomas e carcinomas de Hürthle, também de origem folicular, representam formas variantes de neoplasia. O câncer de tireóide constitui a neoplasia endócrina mais comum, responsável por 1.200 mortes anualmente nos Estados Unidos, sendo maior a incidência de câncer em mulheres e em indivíduos acima de 40 anos. Fatores ambientais influenciam no desenvolvimento do câncer de tireóide, como a exposição à radiação, predispondo ao carcinoma papilífero e fatores nutricionais sugeridos pela maior incidência de carcinoma folicular observada na população iodo-deficiente (1,2).

O câncer surge de uma mutação inicial em algum gene envolvido na regulação de proliferação e/ou diferenciação celular, ocorrendo, então, expansão clonal da célula geneticamente modificada devido à sua maior capacidade de proliferar e escapar ao controle do ciclo celular e dos sinais que induzem a apoptose, predispondo ao acúmulo de mutações sucessivas (3). O entendimento da tumorigênese depende da identificação de mutações que levam à expansão clonal. Na tireóide, padrão de expansão clonal é observado tanto em neoplasias benignas (bócios e adenomas) quanto malignas (4,5). Até o momento, foram identificadas mutações no gene do receptor de TSH (*TSHR*) e mutações de *GSP* em adenomas hiperfuncionantes; mutação de *RAS* é encontrada tanto em lesões benignas quanto malignas, mas predominantemente em carcinoma folicular; rearranjo *PAX-8/PPAR λ* em carcinoma folicular; mutação de *p53* em carcinoma anaplásico, rearranjo *RET/PTC* e de *TRK-T* em carcinoma papilífero e, mais recentemente,

mutação de *BRAF* em carcinoma papilífero. Interessantemente, em carcinomas papilíferos não se observa sobreposição de mutação de genes *RET/PTC* ao de *BRAF* e de *RAS*, refletindo uma diversidade biológica desta neoplasia que necessita ser elucidada. Entretanto, mesmo sem a identificação precisa destas mutações, podemos observar uma série de alterações na expressão ou função de fatores de crescimento, receptores e sinalizadores intracelulares, que auxiliam no entendimento da patogênese, com potencial como marcador em tumores de tireóide (6-8). A figura 1 representa as principais alterações genéticas observadas na tumorigênese da tireóide, idealizadas segundo o modelo Volgenstein de evolução neoplásica progressiva (3).

Discutiremos, a seguir, alterações dos principais fatores envolvidos na proliferação e diferenciação da célula folicular tireoidiana e a contribuição destes na tumorigênese da tireóide. Na tabela 1, os mesmos estão agrupados em diferentes categorias arbitrárias.

Marcadores Específicos da Diferenciação Tireoidiana

Receptor de TSH

TSHR é uma proteína da família de receptores com 7 segmentos transmembranosos associada à proteína G. A sub-unidade da proteína G, *GSP*, transmite o sinal intracelular gerado pela interação do TSH ao receptor, através das vias adenil ciclase/cAMP ou fosfolipase C, regulando a proliferação e síntese de hormônios tireoidianos. Mutações em ponto do gene de *TSH-R* ou do gene de *GSP* resultam na ativação constitutiva, sendo observadas em cerca de 50% do adenoma hiperfuncionante (Doença de Plummer) (9). A ativação constante desta via, independente da presença de TSH, estimula a proliferação e, também, a maior produção de hormônios tireoidianos. As mutações promotoras de “ganho de função” do *TSHR* se concentram na terceira alça citoplasmática ou nos segmentos transmembranosos 6 e 7 (10). Devido à importância desta via regulatória na célula tireoidiana, alterações nesta via poderiam estar presentes em câncer de tireóide. Entretanto, associação entre mutações de *TSH-R* ou de *GSP* e malignidade tireoidiana não é um achado freqüente (11).

Tiroglobulina

A tiroglobulina (TG) é uma glicoproteína de alto peso molecular (660kDa), fundamental para síntese e armazenamento de hormônio tireoidiano. A TG é sintetizada exclusivamente pelas células foliculares tireoidianas, sendo a dosagem sérica utilizada no acompanhamento dos pacientes após terapêutica do câncer. Mais recen-

Tabela 1. Principais marcadores biológicos envolvidos na tumorigênese da tireóide.

Marcadores específicos da diferenciação tireoidiana	Rearranjos Cromossômicos	Reguladores do ciclo celular	Outros marcadores	Genes associados à síndrome familiar
NIS	PAX8/PPAR	EGF/c-erbB	Galectina-3	APC
PAX 8	RET/PTC	HGF/MET	Telomerase	PTEN
Tiroglobulina	TRK-T	IGF		TCO
TPO		TGF		
TSHR		VEGF		
TTF-1		BRAF		
		RAS		
		p53		
		C-MYC		
		KI67		
		PCNA		

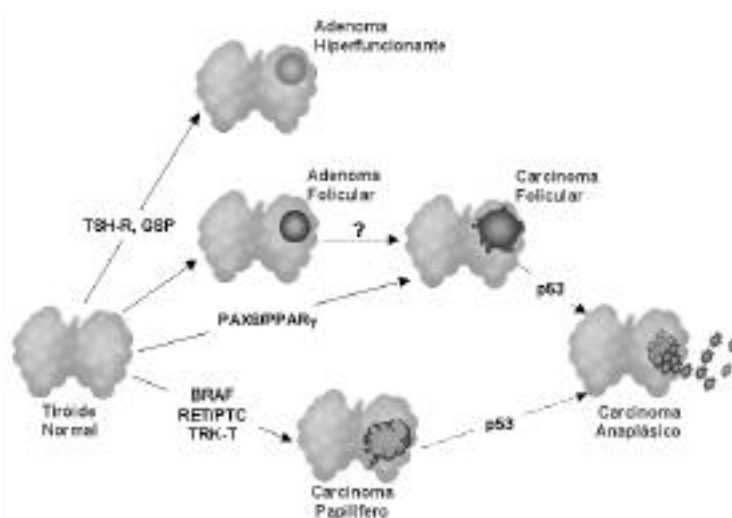


Figura 1. Progressão tumoral da neoplasia da tireóide, com indicação dos genes envolvidos por mutação ou rearranjo. Etapa de evolução, baseada em modelo Vogelstein, segundo o conhecimento atual das alterações genéticas observadas em adenomas e carcinomas da tireóide.

temente, medida de mRNA de TG em sangue periférico tem aumentado a sensibilidade desta investigação para detecção precoce de células foliculares residuais no organismo pós tireoidectomia. Até o momento, não existe associação desta molécula com a tumorigênese da tireóide (12,13).

Peroxidase Tireoidiana

A peroxidase tireoidiana ou TPO (do inglês, *thyroid peroxidase*), enzima específica da célula folicular tireoidiana, desempenha papel fundamental na formação do hormônio tireoidiano, em múltiplas etapas que envolvem o iodo, tais como na catalizando a oxidação do iodo, na organificação da tiroglobulina e acoplamento de iodotironinas. A ausência de expressão de TPO reflete a perda da diferenciação celular, pois esta enzima está

envolvida em importantes etapas da síntese hormonal. Mutação somática de TPO foi observada em nódulos hipocaptantes, sugerindo que esta enzima poderia estar contribuindo para o aumento da proliferação celular (14). Um mecanismo indireto pelo qual mutação no gene TPO poderia favorecer a atividade mitótica da célula folicular seria pela falência na formação de iodolactona, um inibidor de proliferação celular (15). A avaliação do grau de diferenciação dos tumores de tireóide pela análise da expressão protéica de TPO em tecido tumoral ou material de PAAF vem sendo realizada por diferentes grupos. A expressão de TPO é alta em tecidos normais, porém baixa ou ausente em neoplasias malignas. Entretanto, até o momento não existe um consenso que permita utilizar TPO como marcador molecular de malignidade (7,16).

NIS

O NIS (do inglês, *Na/I symporter*) é uma glicoproteína integral da membrana plasmática, responsável pela captação de iodo nas células foliculares tireoidianas e em outros tecidos, como a glândula salivar, glândula mamária e estômago (17).

A presença de NIS na membrana basal da célula folicular garante a entrada de iodo, que será orgânico e armazenado no folículo tireoidiano. Esta característica da tireóide é importante na terapia ablativa por radioiodo e tem garantido o sucesso no tratamento de carcinomas diferenciados de tireóide e de metástases. A redução da concentração de radioiodo é observada em tecidos malignos, sugerindo expressão de NIS diminuída mesmo em carcinomas diferenciados como papilífero e folicular (18,19). Entretanto, outros trabalhos mostram expressão aumentada de mRNA e proteína de NIS em câncer de tireóide (20,21). Embora a imunexpressão de NIS seja observada em câncer de tireóide, estudos imuno-histoquímicos sugerem que a predominante localização intracelular e escassa marcação imuno-histoquímica em membrana plasmática poderiam ser reflexo do comprometimento do *trafficking* da proteína NIS no interior das células foliculares neoplásicas (17). Visando restaurar ou induzir a expressão de NIS em câncer, alguns pesquisadores testaram a capacidade da transferência gênica de NIS em células tumorais para posterior terapêutica com radioiodo (22). Terapia gênica de NIS em câncer de próstata mostrou-se eficaz para tratamento subsequente com I^{131} *in vitro* e *in vivo* (23). Estes resultados experimentais de manipulação do gene NIS são promissores para futura utilização em pacientes com câncer pouco diferenciados de tireóide, assim como naqueles com câncer de outros tecidos.

TTF-1 e PAX8

TTF-1 (do inglês, *thyroid transcription factor 1*), juntamente com PAX8, são importantes fatores de transcrição específicos para os genes da *TG*, *TPO*, *NIS* e receptor de TSH, componentes centrais do desenvolvimento e função celular da tireóide. Camundongos *knockout* de *TTF-1* não conseguem desenvolver a tireóide, e animais, na ausência de PAX8, desenvolvem glândula dis-hormoniogênica, pois não expressam *TG* e *TPO* (24,25). A análise dos níveis de RNA mensageiro em tumores de tireóide mostra que a expressão de TTF-1 e de PAX8 está preservada em adenomas, mas diminuída em carcinoma papilífero e folicular, e ausente em carcinomas anaplásicos. A observação experimental confirma o importante papel da perda funcional de TTF-1 e de PAX8 nos carcinomas indife-

renciados, pois células de carcinomas anaplásicos transfectadas com vetores que induzem a reexpressão destes genes voltam a expressar *TG* e *TPO* (26). Desta forma, mais do que indicadores do estado de diferenciação da célula folicular no câncer, TTF-1 e PAX8 são potentes genes alvos a serem corrigidos em terapia gênica direcionada para o tratamento de carcinoma indiferenciado de tireóide.

Rearranjos Cromossômicos

Rearranjos cromossômicos são associados com câncer e representam um dos mecanismos de ativação de oncogene. *RET/PTC*, *TRK-T* e *PAX8-PPAR 1* são rearranjos típicos observados exclusivamente em câncer de tireóide.

RET/PTC

O gene *RET* codifica um receptor de membrana tirosino-quinase (TK, do inglês *tyrosine-kinase*) envolvido na transdução de sinais para a proliferação, diferenciação e migração no desenvolvimento de células da crista neural. Célula folicular de tireóide normal não expressa *RET*; no entanto, rearranjos de *RET* estão presentes em cerca de 20-25% dos carcinomas papilíferos de tireóide (27). Os rearranjos são resultado da fusão do domínio tirosino-quinase do gene *RET* à porção 5' de genes heterólogos e formam oncogenes quiméricos *RET/PTCs* classificados de 1 a 8 e, mais recentemente, outros dois rearranjos foram descritos (figura 2) (28). Os rearranjos de maior incidência são *RET/PTC 1*, derivado de uma inversão paracêntrica do braço longo do cromossomo 10 resultando no oncogene *D10S170(H4)-RET*, e *RET/PTC 3 e 4*, originados de um rearranjo no cromossomo 10, sobrepondo o domínio *RET-TK* à porção 5' do gene *ELE 1* (28). A ativação constitutiva de *RET/PTC* leva à interação com *SHC*, um intermediário da via de sinalização *RAS*. A capacidade oncogênica de *RET/PTC* é dependente da integridade da via *SHC-RAS-RAF-MEK*.

Em carcinoma papilífero de adulto, o rearranjo mais observado é o *RET/PTC1*. A maior frequência de ativação de *RET/PTC* foi encontrada em crianças com carcinoma papilífero de tireóide, expostas à radiação emitida em Chernobyl, 1996, que, na maioria, apresentavam rearranjo *RET/PTC3* (29).

PAX8/PPAR γ

Rearranjo envolvendo os genes *PAX-8* e *PPAR 1* (do inglês, peroxisome proliferator activated receptor) foi identificado por Kroll e cols. (30) exclusivamente em carcinoma folicular. Este rearranjo é uma translocação *t(2;3)(q13;p25)* que ocasiona a fusão do domínio de

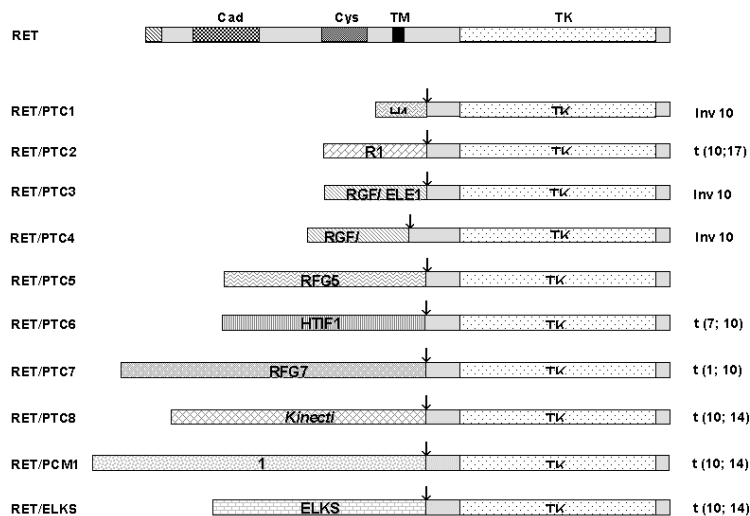


Figura 2. Representação esquemática do produto do proto-oncogene RET e dos oncogenes RET/PTC que são encontrados em carcinomas papilíferos de tireóide. Estão indicados no esquema, a região rica em sítios de ligação à caderina (Cad), região rica em cisteína (Cys), transmembrana (TM) e domínio quinase de tirosina (TK) e os pontos de quebra em carcinomas papilíferos (SETA). E esquerda estão indicadas as aberrações cromossômicas que levam à formação de rearranjos RET. (Modificado a partir do esquema Santoro).

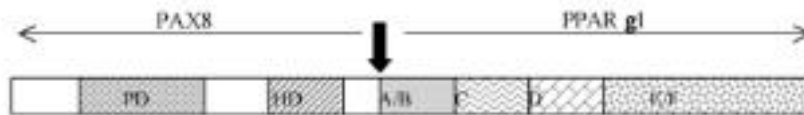


Figura 3. Representação esquemática do rearranjo PAX8-PPAR 1. O rearranjo une os domínios *homeobox* de PAX8 (éxon 7, 8 ou 9) aos domínios receptores nucleares da proteína PPAR (éxon 1). Estão indicados no esquema o ponto de quebra (SETA), os domínios *homeobox* pareado (PD) e parcial (HD) de ligação ao DNA de PAX8, e domínios de receptores nuclear de PPAR 1 (A - F). (Modificado a partir do esquema de Kroll e cols.).

ligação do fator de transcrição de tireóide *PAX8* ao domínio A a F do gene *PPAR*, cujo produto é a proteína quimérica Pax8-PPAR 1 com atividade oncogênica, como mostrado na figura 3. A observação inicial de que mais de 50% dos carcinomas foliculares apresentavam Pax8-PPAR 1, foi confirmada por outros que também mostravam o grande potencial de Pax8-PPAR 1 em distinguir adenoma folicular de carcinoma folicular (30,31). Por outro lado, relatos mais recentes mostram que adenomas apresentam rearranjo Pax8-PPAR 1 em número considerável (32,33). Segundo Kroll (34), Pax8-PPAR 1 está associado ao estadiamento precoce do carcinoma folicular; porém não sabemos, ainda, se o rearranjo que tem sido observado em adenomas por outros autores representaria um indicio precoce de transformação maligna.

TRK-T

NTRK1 codifica um dos receptores do fator de crescimento neural (do inglês *nerve growth factor*), e rear-

ranjos deste genes com seqüências cromossômicas aleatórias resultam em diferentes produtos quiméricos. Estas proteínas, denominadas TRK-T1, TRK-T2 e TRK-T3, apresentam atividade oncogênica e estão presentes em carcinoma papilífero. São menos investigados do que os rearranjos RET/PTC, mas foram observados em 15% dos carcinomas papilíferos (35).

Reguladores do Ciclo Celular

Os fatores de crescimento atuam estimulando ou inibindo a progressão do ciclo celular. Na última década, a influência de grande número de fatores de crescimento com ação proliferativa, entre os quais o fator de crescimento *insulin-like* (IGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), assim como expressão de fatores de crescimento com ação antimitogênica, representados pelo fator de crescimento transformador beta (TGF), foi estudada em células foliculares da tireóide utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Ao mesmo tempo, consoli-

dou-se o conceito de que células foliculares sintetizam fatores de crescimento, os quais contribuem na mitogênese por mecanismo autócrino/parácrino na glândula tireoidiana (36).

Desta forma, mostramos que IGF-I e IGF-II, peptídeos de aproximadamente 7kDa, são expressos em células foliculares da tireóide e atuam de maneira autócrina promovendo a proliferação celular. Em linhagem FRTL-5, o TSH estimula a síntese de mRNA de IGF-II, contribuindo para o seu efeito mitogênico (37-39).

O HGF, um fator mitogênico para células foliculares da tireóide, se liga a um receptor TK específico, o proto-oncogene MET. Diversos mecanismos contribuem para ativação constitutiva de MET, perpetuando o efeito do HGF. Amplificação do MET é observada predominantemente em carcinoma papilífero e anaplásico (40).

A ação proliferativa do EGF inicia-se pela interação com seu receptor EGFR, uma TK codificada pelo proto-oncogene *c-erb-B*, desencadeando cascata que envolve a via MAPK (do inglês MAPK: *mitogen-activated protein kinase*). O aumento de expressão de EGF e de EGF-R é observado em tumores de tireóide, com maior expressão em carcinoma. A ação de EGF pode ser bloqueada tanto pelos inibidores do receptor quanto da via MAPK por ela ativada (41,42).

Durante a evolução da transformação maligna, pode ocorrer falência da célula em sustentar, expressar ou responder a fatores de crescimento inibitórios do ciclo celular. Em tecido epitelial, TGF β é um protótipo de fator de crescimento antiproliferativo que atua na fase G1 tardia do ciclo celular interrompendo a progressão para a fase S.

TGF β é uma proteína dimérica de 25kDa, que inicia sua ação através da ligação com seus receptores de membrana serino-treonina quinase, os quais desencadeiam sinalização intracelular mediada por diversas proteínas da família SMAD (43). O efeito antiproliferativo de TGF β envolve a hipofosforilação de RB, ativação de ciclinas inibitórias e inibição da transcrição de *C-MYC* (44). Em célula folicular da tireóide, o iodo aumenta o mRNA de TGF β e, curiosamente, ambos diminuem expressão do *NIS*, sugerindo uma inter-relação destes fatores na função tireoidiana (45,46). Activina, uma proteína dimérica de cerca de 24kDa, também é membro da superfamília de TGF β e, quando se liga a receptores específicos, desencadeia sinalização intracelular SMAD dependentes, similar ao de TGF β . Inicialmente reconhecidas pelo seu efeito estimulatório na síntese de FSH, as activinas atuam em diversos outros tecidos, inclusive na tireóide (47). Apesar de serem fatores antimitogênicos para célula folicular

tireoidiana, a expressão de diferentes isoformas de TGF (TGF 1, TGF 2 TGF 3) e de activina (activina A, activina B), assim como os SMADS da via de sinalização direcionada para o núcleo celular, SMAD2, SMAD3 e SMAD4, é observada em tumores benignos e em carcinomas de tireóide, o que mostra a integridade desta via (48-50). Por outro lado, a expressão aumentada de SMAD7, uma proteína inibitória da via SMAD 2/3 e 4, em carcinoma e, mais acentuadamente, em linhagem anaplásica de tireóide, sugere um mecanismo de escape à ação de TGF β /activina (51). O escape ao efeito inibitório de TGF β foi observado em cultura primária de tireóide humana proveniente de bócio (52).

A expressão alterada dos fatores de crescimento, tanto estimulatórios quanto inibitórios, nos processos neoplásicos da tireóide não parece ser o fator etiológico, mas uma consequência do processo proliferativo descontrolado, desencadeado por um ou mais eventos-chave ainda desconhecidos.

Fator Angiogênico

Vascular endothelial growth factor (VEGF) é uma glicoproteína de 46kDa, que estimula a formação de vasos sanguíneos, a regeneração endotelial e aumenta a permeabilidade vascular. VEGF possui um importante papel na tumorigênese da tireóide, sendo possivelmente modulado por TSH (53). Linhagens de carcinoma celular secretam maior quantidade de VEGF após estímulo com TSH; entretanto, curiosamente, a administração de TSH recombinante em pacientes mostra diminuição do nível sérico de VEGF. Tanto em linhagens de carcinomas de tireóide quanto em tecidos tumorais, observa-se que o elevado nível de expressão de VEGF está associado a um alto potencial tumorigênico. Carcinomas papilíferos e foliculares apresentam expressão aumentada de mRNA e da proteína VEGF, quando comparada com tecidos normais ou tumores benignos (54). Um estudo experimental mostrou que utilização de anticorpo monoclonal anti-VEGF por via sistêmica é eficaz na redução do tamanho do carcinoma papilífero (55).

Associado ao VEGF, ocorre um aumento da expressão de outros fatores angiogênicos como VEGF-C e angiopoietin-2. A alteração dos níveis destes fatores, combinada com a perda progressiva da expressão de inibidores de VEGF, como trombospondin (TSP-1), pode determinar um fenótipo angiogênico, aumentando o potencial metastático do carcinoma (53).

P53

P53, conhecido como um gene de supressão tumoral, é um fator de transcrição que controla a integridade do genoma celular atuando no reparo do DNA (56). Célula

las que perdem a atividade de P53 tornam-se vulneráveis à transformação maligna, pois acumulariam danos cromossômicos decorrentes da exposição a agentes nocivos, como radiação, droga ou outro estresse. Em câncer de tireóide, a mutação de *P53* que gera proteína inativa é observada em alta incidência em câncer indiferenciado – o carcinoma anaplásico e, quando presente em carcinomas papilífero e folicular, afetam o subtipo pouco diferenciado (57). O reparo da mutação de *P53* em linhagem de carcinoma anaplásico diminui a proliferação celular e restaura a diferenciação, restabelecendo a expressão de *TPO* e *Pax-8* (58,59). A mutação de *P53* é considerada um evento tardio da progressão tumoral, assim sendo, uma terapêutica mais agressiva deveria ser considerada quando carcinomas “ainda” diferenciados apresentam esta mutação.

Sinalizadores Intracelulares

RAS

O proto-oncogene *RAS*, o qual inclui as isoformas *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS*, sintetiza um grupo de proteínas de 21kDa com importante papel na tumorigênese e na progressão tumoral em grande variedade de tecidos. A proteína *RAS* quando ativada desencadeia a via de sinalização intracelular ERK-MAPK (do inglês, ERK: *extracellular ligand-regulated kinase*). A mutação de *RAS*, predominantemente nos códons 12, 13 e 61, é encontrada em ampla gama de tumores humano (30%), inclusive na tireóide (60). Além da mutação que ativa a proteína *RAS* constitutivamente, a amplificação do gene ocasiona instabilidade genômica, propiciando o aparecimento de outras mutações que levam à progressão da transformação neoplásica. Estudos *in vitro* e *in vivo*, onde mutação de *RAS* são introduzidas em células foliculares tireoidianas, observa-se atividade oncogênica, induzindo proliferação e de-diferenciação das células. Curiosamente, foi observado que mutação *H-Ras*^{G12V} ocasiona apoptose em células foliculares, quando estas se encontram em situação de hiper-estímulo da sinalização de TSH-cAMP (61).

Mutação *RAS* é mais comumente encontrada em carcinoma anaplásico (58%), seguida por carcinoma folicular (32%), adenoma folicular (35%), carcinomas papilíferos (18%) e, em menor número, em adenomas hiperfuncionantes (7%) (62).

Mutação de *RAS* é considerada um evento precoce da tumorigênese tireoidiana, pois é observada em lesões benignas de tireóide e, mesmo quando não mutada, a expressão proteica de *RAS* está comumente aumentada em bócios (63). Carcinomas apresentam maior frequência de mutação *RAS*; entretanto, a pre-

sença de mutação não é um indicador útil para prognóstico de comportamento agressivo em tumores de tireóide.

BRAF

BRAF é uma das isoformas da proteína *RAF* e um componente essencial da via *RAS*-*MEK*-*MAPK*, atuando como efetor da sinalização *RAS* nesta cascata (64). A mutação de *BRAF* foi evidenciada recentemente em 66% de melanomas e em cerca de 15% de câncer de colo retal (65). A mutação mais freqüente observada em *BRAF* envolve a translocação de timina pela adenina na posição 1796 (T1796A) no exon 15, o que leva à substituição do aminoácido valina para ácido glutâmico na posição 599 (V599E) da proteína. A troca do aminoácido ativa a proteína, pois propicia a fosforilação constitutiva dos aminoácidos adjacentes, conferindo capacidade oncogênica (figura 4). Em tumores de tireóide, observa-se mutação de *BRAF*^{V599E} em 35% dos carcinomas papilíferos, mas não foi encontrada em nenhum caso de carcinoma folicular, adenoma ou bócio (8,66). Curiosamente, a mutação *BRAF* não ocorre em concomitância à mutação de *RAS* ou de rearranjo *RET-PTC*, indicando alteração genéticas distintas na patogênese do carcinoma papilífero (8). A observação mais recente de mutação *BRAF*, presente em alguns casos de carcinomas anaplásico, associada ao predomínio de mutação em carcinoma papilífero pouco-diferenciado, sugere a possibilidade de um envolvimento de *BRAF*^{V599E} na progressão tumoral mais agressiva (67).

C-MYC, *Ki67* e *PCNA*

A agressividade dos tumores tireoidianos pode ser demonstrada através da atividade proliferativa de suas células. *C-MYC*, antígenos associados ao ciclo celular - *Ki-67* e antígeno nuclear de células em proliferação (*PCNA*) são proteínas nucleares envolvidas na regulação da proliferação celular. A presença destas proteínas é indicativa de células em proliferação celular.

O proto-oncogene *C-MYC* é um fator de transcrição que ativa a expressão de uma série de genes regulatórios da proliferação e diferenciação celular, e sua expressão constitutiva está associada a diversos tumores. Na tireóide, fatores de crescimento e TSH induzem a expressão de *C-MYC*, ativando a progressão do ciclo celular. Em linhagens celulares mais agressivas da tireóide, observa-se maior expressão de *C-MYC*, sugerindo envolvimento deste gene na progressão tumoral. Entretanto, em tecidos de tumores de tireóide, foi descrita alta expressão de *C-MYC*, tanto em neoplasias benignas quanto malignas da tireóide (68).

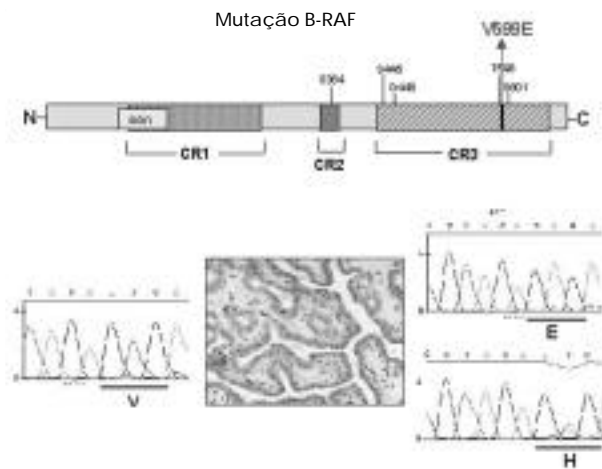


Figura 4. Mutações de *BRAF*. A) Representação esquemática da estrutura da proteína B-RAF e localização da mutação ativadora (V599E) observada em carcinoma papilífero. Estão indicadas as três regiões conservadas (CR1, CR2 e CR3) entre as isoformas RAF, o domínio de ligação à RAS (RBD) e a posição de potenciais sítios de fosforilação de B-RAF. B) Cromatogramas representativas da mutação pontual de *BRAF* no éxon 15 trocando o aminoácido valina (V) pelo ácido glutâmico (E). A presença de heterozigose indica mutação de *BRAF* (H).

O Ki-67 e o PCNA são marcadores localizados no núcleo celular e são bastante utilizados para identificar células em proliferação, normalmente em conjunto com outros oncogenes. O anticorpo monoclonal Ki-67 detecta uma proteína nuclear, originalmente descrita por Gerdes e cols. (69), e deriva de camundongos imunizados com o núcleo da linhagem celular L428. Este anticorpo marca núcleos das células em diferentes fases do ciclo celular (fase G1, S, G2 e M), mas não marcam aqueles em quiescência (G0). Além da tentativa de utilização isolada deste marcador no carcinomas de tireóide, onde a expressão está aumentada, o Ki-67 foi utilizado em conjunto com a investigação de P53 (70). O PCNA, um polipeptídeo nuclear de 36kDa, é uma proteína auxiliar à DNA polimerase, sintetizada durante as fases G1 tardia e S do ciclo celular. Um anticorpo monoclonal específico, PC10, é capaz de detectar esta proteína no núcleo da célula em proliferação em ensaio imunohistoquímico (71). Células PCNA positivas, como indicador de proliferação, estão aumentadas em carcinomas folicular e papilífero em comparação aos tecidos normais. Em carcinomas anaplásicos, o índice de células PCNA positivas é extremamente alto e se correlaciona com a expressão de p53 (72). Entretanto, apesar da tentativa de associar a positividade de PCNA para auxiliar no diagnóstico, este marcador não é capaz de discriminar lesões tumorais benignas de malignas.

Outros Marcadores

Telomerase

Telomerase humana é uma transcriptase reversa, constituída de uma sub-unidade de RNA (hTR) e uma sub-unidade protéica catalítica (hTERT), responsável pela síntese do DNA telomérico. Os telômeros são seqüências de DNA repetitivas, (TTAGGG)_n, localizadas nas extremidades dos cromossomos. A manutenção da estabilidade cromossômica durante a replicação do DNA é mantida pela presença dos telômeros. A telomerase é abundante em células embrionárias, mas está ausente na maioria dos tecidos somáticos adultos. Entretanto, em células tumorais, há uma franca atividade telomerase (73).

Na tireóide, estudos em tecidos e linhagens celulares tumorais utilizando ensaio TRAP mostram que a atividade da telomerase é predominantemente observada em carcinomas diferenciados e indiferenciados, mas pouco observada ou ausente em adenomas foliculares e tecido normal (74,75). A medida da atividade da telomerase poderia representar uma importante ferramenta diagnóstica e prognóstica; no entanto, além de ser um procedimento difícil e pouco utilizado em laboratórios clínicos, o ensaio TRAP pode gerar resultados falso-positivos devido à infiltração de linfócitos. Alternativamente, detecção da expressão mRNA de hTERT foi realizada em tecidos tumorais de punção aspirativa de agulha fina (PAAF), mostrando que o mRNA de hTERT é expresso, predominante, em tumores malignos e ausente nos tumores benignos; entretanto, outros mostram expressão de mRNA de hTERT em 42% dos tumores benignos e 63% dos malignos (7,76,77).

Além dos resultados contraditórios, as dificuldades metodológicas do ensaio, tanto por TRAP ou por hTERT, dificultam a utilização sistemática da medida da telomerase na prática clínica. Recentemente, um procedimento menos trabalhoso e altamente sensível de ensaio TRAP poderá facilitar a investigação de atividade telomerase (75).

Galectina-3

Galectina-3 é um membro da crescente família de lectinas animais, ligando -galactosídeos, que desempenha múltiplas funções biológicas, tais como, na adesão celular, proliferação, diferenciação e progressão tumoral (78). Na tireóide, desde os trabalhos iniciais que mostravam que mais de 90% de lesão tireoidiana maligna expressavam galectina 3, expressão esta observada quase que exclusivamente em carcinomas folicular e papilífero, sugeria que galectina-3 poderia ser um marcador de malignidade em neoplasia da tireóide (79-

81). Neste contexto, em trabalho recente, observou-se que expressão da proteína galectina-3 não é exclusiva de tumores malignos, e está expressa em adenomas foliculares (14/31) e bócios multinodulares (4/24) (82). A avaliação dos níveis de mRNA de galectina-3 revelam que, tanto carcinomas quanto adenomas e bócios, expressam mRNA de galectina-3 (82). Assim como, em material proveniente de punção aspirativa de agulha fina (PAAF) de adenomas e bócios multinodulares de crianças e adolescentes, foi detectado mRNA de galectina-3 (83). Assim sendo, uma vez que expressão de galectina-3 não é exclusiva de tumores malignos, a utilização da expressão de galectina-3 em material proveniente PAAF, como ferramenta para diagnóstico pré-cirúrgico, deve ser interpretada com cautela, principalmente na distinção entre adenoma e carcinoma folicular.

Tumores de Tiróide Familiar Não Medular

Ao contrário do carcinoma medular familiar, neoplasias foliculares com caráter familiar não são frequentes, correspondendo a 5% dos casos de carcinoma papilífero. As neoplasias foliculares não medulares familiares são geralmente multifocais, mais agressivas, com maior frequência de recorrência, com início em idade mais precoce do que os casos esporádicos. As síndromes familiares não medulares são menos conhecidas, porém tem se procurado um elo que possa agrupar os carcinomas papilíferos de membros de mesma família. São chamados "carcinoma papilífero familiar", mas, até o momento, não se conhece nenhuma alteração genética específica. Há poucas síndromes genéticas associadas ao carcinoma de tiróide "não medular". A associação de neoplasias foliculares de tiróide com síndromes genéticas não são frequentes. Dentre estas, podemos citar a síndrome de Cowden, polipose adenomatosa familiar, e TCO (do inglês, *thyroid tumors with cell oxyphilia*) associadas a mutações germinativas de genes *PTEN*, *APC* e *TCO*, respectivamente (84,85).

Perspectivas

Inúmeras estratégias estão sendo desenvolvidas para aperfeiçoar os métodos diagnósticos, assim como para buscar terapias mais eficientes no combate ao câncer de tiróide. Desta forma, é de extrema importância buscarmos novos genes associados à tumorigênese da glândula tireóide, assim como o melhor entendimento das alterações moleculares, para que métodos mais precisos de diagnóstico auxiliem no estabelecimento de conduta terapêutica diferenciada para os tipos distintos de neoplasias da tiróide.

Estudos da perda de heterozigiosidade identificaram regiões cromossômicas, tais como 2p, 2q, 3p, 7q, 10q, 11q e 17p, que são mais vulneráveis à perda de material genético em carcinomas de tiróide (86). Estas regiões cromossômicas merecem uma cuidadosa investigação, por representar potenciais localizações de genes candidatos em neoplasia tireoidiana.

As informações genéticas em larga escala, provenientes da conclusão de seqüenciamento do genoma humano e número crescente de seqüências expressas ESTs (do inglês, *Expressed Sequence Tags*) nos bancos de dados genômicos, favorecem inúmeros métodos de investigação inovadores (87,88). Algumas destas metodologias baseadas em genômica, tais como *microarrays*, estudo citogenético em larga escala e SAGE (do inglês, *Serial Analysis of Gene Expression*), poderão revelar o perfil molecular da doença, do paciente e até mesmo da eficácia terapêutica (89). Um outro aspecto importante envolve a busca de alternativas de tratamento, principalmente para os casos de carcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados, não responsivos à terapêutica convencional, os quais incluem cirurgia, radioiodoterapia e terapia supressora de TSH com T₄. Para esta finalidade, novas estratégias terapêuticas estão sendo investigadas, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (90,91). Embora a patogenia dos tumores envolva mecanismo multifatorial, é possível bloquear um único gene e obter resultados surpreendentes. Assim sendo, o uso de drogas ou anticorpos que atuam bloqueando os componentes da sinalização ativada constitutivamente no câncer, silenciamento de oncogenes através de métodos de *anti-sense* de mRNA ou através de uma técnica descrita mais recentemente, a interferência de RNA, imunoterapia, entre outros, poderão trazer benefícios futuros (55,68,92). A terapia gênica torna possível a reintrodução de um gene defeituoso ou deletado na tumorigênese, como o gene *P53*, a imunização genética e introdução de agentes angiogênicos, a indução da expressão de "genes suicidas" por promotores de genes específicos da tiróide, como o da TG, em células tumorais e a restauração da expressão de NIS em células tumorais foliculares para torná-las responsivas à radioiodoterapia (23,26,58,90).

Podemos concluir que os conhecimentos acumulados no entendimento dos eventos genéticos e moleculares que envolvem os tumores de tiróide ainda são insuficientes, assim sendo, persiste o desafio para obtermos marcadores que auxiliem no diagnóstico clínico e indiquem terapêuticas melhor direcionadas. O desafio maior tem sido identificar marcadores capazes de distinguir tumores de tiróide malignos de

benignos, que sejam especificamente sensíveis para identificar os limites entre adenoma folicular e carcinoma folicular.

REFERÊNCIAS

- Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1998;338:297-306.
- Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501-11.
- Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-41.
- Veschimann S, Kopp PA, Kimura ET, Zbaeren J, Tobler A, Fey MF, et al. Morphological and functional polymorphism within clonal thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:846-51.
- Kopp P, Kimura ET, Aeschimann S, Oestreicher M, Tobler A, Fey MF, et al. Polyclonal and monoclonal thyroid nodules coexist within human multinodular goiters. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:134-9.
- Puxeddu E, Fagin JA. Genetic markers in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:493-513.
- Haugen BR, Woodmansee WW, McDermott MT. Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;56:281-90.
- 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;63:1454-7.
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 1993;365:649-51.
- Trulzsch B, Nebel T, Paschke R. The thyrotropin receptor mutation database. *Thyroid* 1999;9:521-2.
- Matsuo K, Friedman E, Gejman PV, Fagin JA. The thyrotropin receptor (TSH-R) is not an oncogene for thyroid tumors: structural studies of the TSH-R and the alpha-subunit of Gs in human thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1446-51.
- Ringel MD, Ladenson PW, Levine MA. Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4435-42.
- Biscolla RP, Cerutti JM, Maciel RM. Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse transcription-polymerase chain reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid transcripts in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3623-7.
- Krohn K, Paschke R. Loss of heterozygosity at the thyroid peroxidase gene locus in solitary cold thyroid nodules. *Thyroid* 2001;11:741-7.
- Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ, Bocanera LV, Pregliasco LB, Sartorio G, et al. Studies on the goiter inhibiting action of iodolactones. *Eur J Pharmacol* 1994;258:33-7.
- De Micco C, Ruf J, Chrestian MA, Gros N, Henry JF, Carayon P. Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissues. *Cancer* 1991;67:3036-41.
- Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, et al. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 2003;24:48-77.
- Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Filetti S, et al. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3228-34.
- Ward LS, Santarosa PL, Granja F, da Assumpção LV, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Lett* 2003;200:85-91.
- Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, et al. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1998;101:1296-300.
- Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2697-700.
- Cho JY. A transporter gene (sodium iodide symporter) for dual purposes in gene therapy: imaging and therapy. *Curr Gene Ther* 2002;2:393-402.
- Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, et al. *In vivo* sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Ther* 2001;8:1524-31.
- Di Lauro R. Molecular abnormalities of organogenesis and differentiation of the thyroid gland. *Ann Endocrinol (Paris)* 2003;64:53.
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 1998;19:87-90.
- Ros P, Rossi DL, Acebron A, Santisteban P. Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis. *Biochimie* 1999;81:389-96.
- Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60:557-63.
- Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann NY Acad Sci* 2002;963:116-21.
- Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 1997;57:1690-4.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000;289:1357-60.
- Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4440-5.

32. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3947-52.
33. Nakabashi CCD, Cerutti JM, Guimarães GS, Michaluart Jr P, Ward LS, Maciel RMB. Detection of the PAX8/PPAR-gama1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. In: 75th Annual Meeting of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2003;13:731.
34. French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin W, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1053-60.
35. Greco A, Mariani C, Miranda C, Pagliardini S, Pierotti MA. Characterization of the NTRK1 genomic region involved in chromosomal rearrangements generating TRK oncogenes. *Genomics* 1993;18:397-400.
36. Bidey SP, Hill DJ, Eggo MC. Growth factors and goitrogenesis. *J Endocrinol* 1999;160:321-32.
37. Maciel RM, Kimura ET, Takahashi MH, Lopes MH, Mesquita MI, Moses AC, et al. Insulin-Like Growth Factor I in Human Thyroid Tissue: Specific Localization by Immunohistochemistry and *In Situ* Hybridization. *Endocr Pathol* 1995;6:207-15.
38. Maciel RM, Moses AC, Villone G, Tramontano D, Ingbar SH. Demonstration of the production and physiological role of insulin-like growth factor II in rat thyroid follicular cells in culture. *J Clin Invest* 1988;82:1546-53.
39. Kimura ET, T LM, Maciel RMB, C BA. Thyrotropin (TSH) regulates the expression of IGFII mRNA in FRTL-5 cells. In: *International thyroid conference, 1990, Haia. Progress in Thyroid Research*. Rotterdam: Balkema Publisher, 1991. v.1.p.551-3.
40. Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, Prat M, Bongarzone I, Pilotti S, et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992;7:2549-53.
41. Lemoine NR, Hughes CM, Gullick WJ, Brown CL, Wynford-Thomas D. Abnormalities of the EGF receptor system in human thyroid neoplasia. *Int J Cancer* 1991;49:558-61.
42. Holting T, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Epidermal growth factor (EGF)- and transforming growth factor alpha-stimulated invasion and growth of follicular thyroid cancer cells can be blocked by antagonism to the EGF receptor and tyrosine kinase in vitro. *Eur J Endocrinol* 1995;132:229-35.
43. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*2003;113:685-700.
44. Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massague J. Myc down-regulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol* 1999;19:5913-22.
45. Cowin AJ, Davis JR, Bidey SP. Transforming growth factor-beta 1 production in porcine thyroid follicular cells: regulation by intrathyroidal organic iodine. *J Mol Endocrinol* 1992;9:197-205.
46. Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, Onaya T. Transforming growth factor-beta1 suppresses thyrotropin-induced Na⁺/I⁻ symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* 1997;7:789-94.
47. Pangas AS, Woodruff TK. Activin signal transduction pathways. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:309-14.
48. Kimura ET, Kopp P, Zbaeren J, Asmis LM, Ruchti C, Maciel RM, et al. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in multinodular goiters and differentiated thyroid carcinomas: a comparative study. *Thyroid* 1999;9:119-25.
49. Matsuo SE, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CU, Kimura ET. Activin betaB Expression in Rat Experimental Goiter and Human Thyroid Tumors. *Thyroid* 2003;13:239-47.
50. Matsuo SE, Ebina KN, Martins L, Kimura ET. Expression of TGFb/Activin signaling mediators, Smad 2/3, Smad4 and Smad7 in thyroid tumors. In: 75th Annual Meeting of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2003;13:717.
51. Cerutti JM, Ebina KN, Matsuo SE, Martins L, Maciel RM, Kimura ET. Expression of Smad4 and Smad7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines. *J Endocrinol Invest* 2003;26:516-21.
52. Asmis LM, Kaempf J, Von Gruenigen C, Kimura ET, Wagner HE, Studer H. Acquired and naturally occurring resistance of thyroid follicular cells to the growth inhibitory action of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1). *J Endocrinol* 1996;149:485-96.
53. Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J Endocrinol* 2000;166:475-80.
54. Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, et al. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3741-7.
55. Bauer AJ, Patel A, Terrell R, Doniparthi K, Saji M, Ringel M, et al. Systemic administration of vascular endothelial growth factor monoclonal antibody reduces the growth of papillary thyroid carcinoma in a nude mouse model. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:192-9.
56. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
57. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993;91:179-84.
58. Fagin JA, Tang SH, Zeki K, Di Lauro R, Fusco A, Gonsky R. Reexpression of thyroid peroxidase in a derivative of an undifferentiated thyroid carcinoma cell line by introduction of wild-type p53. *Cancer Res* 1996;56:765-71.
59. Moretti F, Farsetti A, Soddu S, Misiti S, Crescenzi M, Filetti S, et al. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene* 1997;14:729-40.
60. Barden CB, Shister KW, Zhu B, Guitier G, Greenblatt DY, Zeiger MA, et al. Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clin Cancer Res* 2003;9:1792-800.
61. Shirokawa JM, Elisei R, Knauf JA, Hara T, Wang J, Saavedra HI, et al. Conditional apoptosis induced by oncogenic Ras in thyroid cells. *Mol Endocrinol* 2000;14:1725-38.
62. Suarez HG. Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis. *CR Acad Sci III* 2000;323:519-28.

63. Studer H, Gerber H, Zbaeren J, Peter HJ. Histomorphological and immunohistochemical evidence that human nodular goiters grow by episodic replication of multiple clusters of thyroid follicular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1151-8.
64. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochem Biophys Acta* 2003;1653:25-40.
65. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
66. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22:4578-80.
67. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, 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 (in press)
68. Cerutti J, Trapasso F, Battaglia C, Zhang L, Martelli ML, Visconti R, et al. Block of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human thyroid carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 1996;2:119-26.
69. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-5.
70. Muller-Hocker J. Immunoreactivity of p53, Ki-67, and Bcl-2 in oncocytic adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Hum Pathol* 1999;30:926-33.
71. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987;326:515-7.
72. Fucich LF, Freeman SM, Marrogi AJ. An immunohistochemical study of leu 7 and PCNA expression in thyroid neoplasms. *Biotech Histochem* 1996;71:298-303.
73. Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet* 2003;362:983-8.
74. Haugen BR, Nawaz S, Markham N, Hashizumi T, Shroyer AL, Werness B, et al. Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 1997;7:337-42.
75. Dalla Torre CA, Maciel RM, Pinheiro NA, Andrade JA, De Toledo SR, Villa LL, et al. TRAP-silver staining, a highly sensitive assay for measuring telomerase activity in tumor tissue and cell lines. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:65-8.
76. Zeiger MA, Smallridge RC, Clark DP, Liang CK, Carty SE, Watson CG, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms. *Surgery* 1999;126:1195-8;discussion 8-9.
77. Liou MJ, Chan EC, Lin JD, Liu FH, Chao TC. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms. *Cancer Lett* 2003;191:223-7.
78. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:263-73.
79. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995;147:815-22.
80. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001;357:1644-50.
81. Nascimento MC, Bisi H, Alves VA, Longatto-Filho A, Kanamura CT, Medeiros-Neto G. Differential reactivity for galectin-3 in Hurthle cell adenomas and carcinomas. *Endocr Pathol* 2001;12:275-9.
82. Martins L, Matsuo SE, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CU, Kimura ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4806-10.
83. Niedziela M, Maceluch J, Korman E. Galectin-3 is not an universal marker of malignancy in thyroid nodular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4411-5.
84. Malchoff CD, Malchoff DM. The genetics of hereditary nonmedullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2455-9.
85. Eng C. Role of PTEN, a lipid phosphatase upstream effector of protein kinase B, in epithelial thyroid carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2002;968:213-21.
86. Ward LS, Brenta G, Medvedovic M, Fagin JA. Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:525-30.
87. de Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, Costa FF, Nagai MA, Verjovski-Almeida S, et al. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12690-3.
88. Camargo AA, Samaia HP, Dias-Neto E, Simão DF, Migotto IA, Briones MR, et al. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12103-8.
89. Dahia P. Descobrimos genes no século XXI: Enfoque na área de onco-endocrinologia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46:341-50.
90. Schmutzler C, Koehrlé J. Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 2000;143:15-24.
91. Fagin JA. Perspective: lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer — insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets. *Endocrinology* 2002;143:2025-8.
92. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:457-67.

Endereço para correspondência:

Edna T. Kimura
Departamento de Histologia & Embriologia, ICB, USP
Av Prof Lineu Prestes 1524
05508-900 São Paulo, SP
e.mail: etkimura@usp.br