

Nódulos com Diagnóstico de Padrão Folicular: Marcadores Biológicos São o Futuro?

perspectiva

RESUMO

JANETE M. CERUTTI

Disciplina de Genética,
Departamento de Morfologia e
Disciplina de Endocrinologia,
Departamento de Medicina,
Universidade Federal de São
Paulo, SP.

Com o uso da ultra-sonografia de alta resolução, a prevalência de nódulos tem aumentado e, conseqüentemente, o número de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), que é o método de escolha para diagnóstico inicial. Um dos maiores dilemas clínicos para o citologista é o diagnóstico diferencial das lesões foliculares comumente agrupadas na classe padrão folicular. Neste artigo de revisão, discutiremos quais são as lesões que podem ser assim classificadas e os marcadores moleculares, identificados por nós ou por outros grupos, que são capazes de distinguir as lesões benignas das malignas. (Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/5:832-843)

Descritores: Padrão folicular; Marcadores moleculares; Adenoma folicular da tiróide; Carcinoma folicular da tiróide; PAAF; Diagnóstico

ABSTRACT

Nodule Diagnosed as Follicular Patterned Lesion: Are Biomarkers the Promise?

There are an increasing number of thyroid nodules found by ultrasound and sampled by fine needle aspiration (FNA). A clinical problem is the accurate distinction between benign and malignant forms of follicular lesion. In this review we discuss the thyroid lesions that are common sources of diagnostic error, and grouped together as follicular patterned lesion, and the molecular markers identified by us and others, and that are able to distinguish the benign from the malignant ones. (Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/5:832-843)

Keywords: Follicular patterned; Biomarkers; Follicular thyroid adenoma; Follicular thyroid carcinoma; FNA; Diagnosis

NÓDULO COM DIAGNÓSTICO DE PADRÃO FOLICULAR, "A CATCH-ALL TERM"

OS NÓDULOS DA TIRÓIDE SÃO ENCONTRADOS em prevalência de aproximadamente 4-7% na população. Com o advento da ultra-sonografia de alta resolução, uma técnica simples, barata, de fácil acesso e sensível, capaz de identificar nódulos a partir de 2 mm, a prevalência de nódulos pode chegar a 67% (1,2). Portanto, na maioria das vezes, os nódulos são impalpáveis e identificados nas ultra-sonografias cervicais realizada por razões nem sempre relacionadas à tiróide. Sendo os nódulos da tiróide um problema clínico comum, o que o médico deve fazer?

A conduta clínica depende da avaliação inicial. O método de escolha para avaliação inicial dos nódulos tiroidianos, na maioria dos serviços, é a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) com subsequente análise citológica. O principal objetivo da PAAF é diferenciar os nódulos com

Recebido em 12/02/07
Aceito em 16/02/07

maior risco de malignidade, e que devem ser encaminhados para cirurgia, dos nódulos tireoidianos, que devem ser seguidos clinicamente.

Na citologia, os nódulos podem ser classificados como benignos (60–70%), malignos (5–10%), indeterminados (10–20%) ou inadequados (10–15%) (3,4). Quanto aos nódulos diagnosticados como inadequados na citologia, estes podem ser submetidos a uma nova PAAF. No entanto, os nódulos classificados como indeterminados representam um dilema clínico devido à dificuldade de classificá-los como benignos ou malignos. Quais são essas lesões cujo diagnóstico na PAAF representa um desafio para o citologista e diminui a acurácia do método?

Este dilema clínico ocorre, sobretudo, nos casos de adenoma folicular da tireóide (AFT) e de carcinoma folicular da tireóide (CFT) (5,6). A dificuldade de diagnóstico diferencial é decorrente, além da semelhança citológica das duas lesões, da impossibilidade de verificar na PAAF se há invasão de vasos e/ou cápsula, que são os critérios que determinam malignidade. Para estes nódulos, tem sido recomendado o uso do termo lesão folicular ou, ainda, padrão folicular (PF).

Além do adenoma folicular e do carcinoma folicular, o termo citológico PF também pode incluir outras condições que podem levar a dificuldade no diagnóstico. Estas lesões são os nódulos hiperplásicos (NH), adenomas de Hürthle (AH), carcinomas de Hürthle (CH) e a variante folicular do carcinoma papilífero da tireóide (VFCPT) (6-9). Nos casos de AH e CH, que são considerados variantes dos tumores foliculares, os critérios de malignidade seguem àqueles determinados para o AFT e CFT e, portanto, necessitam de análise histológica para verificar invasão de vasos e/ou cápsula. No caso da VFCPT, os critérios de diagnóstico citológico de carcinoma papilífero (CPT) podem estar ausentes e, nestes casos, apresentam características citológicas que se assemelham ao AFT ou CFT (6,8).

Além disso, vários grupos observaram que um grande número dos casos de nódulos diagnosticados como PF na PAAF eram, na análise histológica final, casos de VFCPT, ou ainda de CPT (10-13). Estes achados demonstram que mesmo o CPT, cuja sensibilidade e especificidade na PAAF se aproxima de 100%, também pode ser uma fonte de dificuldade para o diagnóstico na PAAF.

Embora de 10–30% de todas as PAAFs resultem no diagnóstico PF, e estes possam corresponder a qualquer uma das entidades acima citadas, na prática clínica somente 20% dos nódulos têm diagnóstico de carcinoma na análise histológica final (3,14,15). Assim, a maior parte dos nódulos removidos cirurgica-

mente são nódulos benignos (6). Isso se deve principalmente ao excesso de tratamento, pois, embora o diagnóstico falso-positivo na citologia de tireóide seja indesejável, a maior preocupação são os falso-negativos devido ao atraso no tratamento.

Para minimizar o número de cirurgias desnecessárias ou sérias conseqüências no atraso do tratamento, vários grupos têm procurado aumentar a sensibilidade e especificidade do teste pré-operatório.

Balochi e cols. sugerem que sejam observadas certas características nucleares sugestivas de CPT, os nódulos com diagnóstico de PF poderiam ser subdivididos em duas classes: neoplasias foliculares ou neoplasias foliculares suspeitas para CPT (9,16). Levando em consideração tais características, o grupo observou uma taxa de malignidade de 35% nos casos de nódulos inicialmente diagnosticados como PF, e de 72% nos nódulos inicialmente classificados como PF suspeitos para CPT (17). Entre os nódulos diagnosticados como PF, a maioria era composta por AFT (33%) e bócio (31%), seguida por VFCPT (22%). Entre os 72% inicialmente diagnosticados como suspeitos para CPT, o diagnóstico observado com maior frequência foi de VFCPT (54%), seguido por bócio nodular (20%), CPT (12%), AFT (8%), CFT (4%) e CCH (2%).

Nos casos de AFT, CFT, ACH e CCH, cujo critério de diferenciação é invasão de vasos e/ou cápsula, a análise citológica isoladamente não resultará no aumento da acurácia do teste. Vários protocolos foram realizados com o intuito de determinar parâmetros clínicos que pudessem identificar os nódulos com alto risco de malignidade daqueles com menor risco (10). Entretanto, nenhum dos parâmetros foi satisfatório.

A compreensão do genoma humano e o avanço das técnicas moleculares têm revolucionado a prática clínica. Estes avanços tiveram profundas implicações no diagnóstico, no planejamento do tratamento individualizado e no desenvolvimento de novas drogas em várias áreas da medicina, incluindo a endocrinologia.

Com relação ao diagnóstico dos nódulos tireoidianos, vários grupos investigaram alterações genéticas específicas das lesões benignas ou malignas ou ainda investigaram o perfil de expressão gênica das lesões inicialmente classificadas como PF com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos que possam ser utilizados como marcadores de diagnóstico. Os marcadores identificados com estas análises têm sido testados quanto à eficiência em classificar os nódulos como benignos ou malignos utilizando várias metodologias como, por exemplo, RT-PCR, ensaio de atividade enzimática e imunistoquímica. Neste trabalho de revisão serão discutidos os principais marcadores mo-

leculares identificados e que, em associação com a PAAF, oferecem perspectivas no diagnóstico diferencial dos nódulos inicialmente classificados como PF.

PAX8-PPAR γ UM MARCADOR MOLECULAR CAPAZ DE DIFERENCIAR AS LESÕES BENIGNAS DAS MALIGNAS?

Entre as alterações genéticas identificadas e inicialmente associadas à patogênese do CFT, destaca-se o rearranjo envolvendo os genes *PAX8* e *PPAR γ* (18). Este evento somático de translocação justapõe a região 5' do gene *PAX8* (2q13) ao exon 1 do gene *PPAR γ* (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) (3p25). Até o momento, algumas variantes têm sido observadas em decorrência dos diferentes pontos de quebra no gene *PAX8*, que podem ocorrer nos exons 7-9 (19,20). As quebras observadas no gene *PPAR γ* ocorrem no exon 1 do gene (figura 1). A proteína de fusão formada tem aproximadamente 87-99 kDa.

Na descrição original, o gene quimérico formado em decorrência desta translocação estava presente em 5/8 (63%) casos de CFT investigados. Por outro lado, o rearranjo não foi detectado em nenhum dos casos de adenoma folicular (0/20), bócio (0/10) e carcinoma papilífero da tireóide (0/10) (18). Os autores sugeriram que este marcador poderia diferenciar o CFT do AFT. Estes dados são extremamente interessantes porque é o primeiro evento genético associado especificamente com CFT e porque já havia sido observada em análise citogenética a perda de 3p em CFTs, sugerindo que provavelmente nesta região haviam genes supressores de tumor (21).

Entretanto, vários grupos, incluindo o nosso, reportaram a ocorrência deste rearranjo em 8-55% dos casos de AFT (20,22,23). Além disso, a frequência do rearranjo nos casos de CFT é inferior à reportada por Kroll e cols., com uma prevalência acumulativa de 30% (24). Outras alterações envolvendo 3p25 como, por exemplo, trissomia, tetrassomia e trissomia associada a monossomia parcial, foram identificadas em casos de CFT (25). Recentemente, este rearranjo foi detectado em casos de VFCPT (26,27). Os autores sugerem que alguns casos de VFCPT apresentam características moleculares semelhantes aos CFT.

A partir destes achados, muitas questões foram levantadas. Por exemplo, qual o real papel desta proteína na patogênese dos tumores foliculares? Este evento ocorre precocemente e, de fato, os AFT com este rearranjo são formas mais agressivas e devem ser tratados como CFT? Este marcador pode prever a evolução

clínica? Sendo *PAX8* e *PPAR γ* fatores de transcrição, quais são as vias de sinalização que estão comprometidas? Diferentes vias de sinalização foram ativadas em decorrência deste rearranjo? Serão as vias associadas ao *PPAR γ* fundamentais, uma vez que aneuploidias envolvendo o 3p25 foram identificadas em casos de CFT? Eventos genéticos adicionais são necessários para a transformação maligna das células foliculares da tireóide? Novas drogas que têm como alvo esta proteína de fusão serão mais eficientes no tratamento dos pacientes com CFT e rearranjo *PAX8-PPAR γ* ?

Com relação à expressão desta proteína e sua associação com a apresentação clínica e evolução, existem controvérsias. Em trabalhos posteriores, o grupo de Kroll reforça a sua posição de que este rearranjo está associado à patogênese dos CFT. O grupo sugere que o rearranjo ou a aneuploidia observada possam ser eventos subsequentes a outras alterações e estão presentes em CFT mais agressivos. Discute, ainda, que a positividade nos casos de adenoma folicular, descrita pelos outros grupos, deve indicar a presença de carcinomas foliculares *in situ* e, portanto, AFT com um prognóstico menos favorável (25). Nikiforova e cols. confirmam a associação entre rearranjo *PAX8-PPAR γ* e CFTs mais agressivos e sugerem que a exposição à radiação pode ser o mecanismo responsável pela geração deste evento genético (28). Sahin e cols. sugerem que a expressão da proteína de fusão, investigada através da expressão do *PPAR γ* por imunistoquímica, está associada a um subtipo menos agressivo (29).

Com relação ao mecanismo molecular, Kroll e cols. acreditam que a proteína de fusão (figura 1) contribui para a patogênese do CFT porque inibe a função da proteína *PPAR γ* normal produzida na célula através do efeito dominante-negativo (18). Martelli e

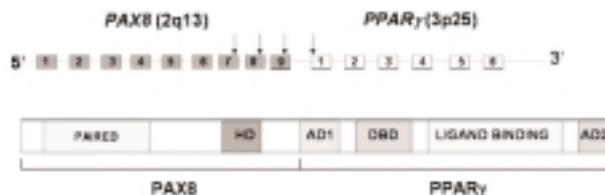


Figura 1. Rearranjo dos genes *PAX8* e *PPAR γ* . O gene de fusão codifica uma proteína de aproximadamente 87-98 kDa, dependendo do ponto de quebra no gene *PAX8*. Mais de uma isoforma podem ser detectadas no mesmo paciente. A proteína de fusão contém os domínios de ligação ao DNA que compreendem (PAIRED e HD) do gene *PAX8* e os domínios de transativação (AD1 e AD2), associação ao ligando, dimerização com RXR e de ligação ao DNA (DBD) do gene *PPAR γ* .

cols. demonstraram que a proteína PPAR γ , quando re-expressa em linhagens celulares de carcinoma de tireóide, inibe o crescimento celular, promove parada no ciclo celular e induz apoptose (30). Estudos posteriores demonstraram que a proteína de fusão foi capaz de estimular o crescimento das células, interferir na progressão do ciclo celular e inibir apoptose (31). Mais recentemente, em um modelo biológico onde a proteína de fusão foi constitutivamente expressa em diferentes linhagens celulares, foi demonstrado que as vias de sinalização controladas por PAX8-PPAR γ são complexas e dependem do tipo celular. Os autores acreditam que a inapropriada expressão de genes responsivos a PPAR γ ou PAX8, associada à inibição da expressão de outros genes, seja o mecanismo pelo qual essa proteína contribua para o crescimento celular e perda da diferenciação (32).

Embora esses trabalhos citados e outros que investigaram genes diferencialmente expressos nos tumores que apresentam este rearranjo (33,34) tenham contribuído para a compreensão da patogênese dos tumores foliculares da tireóide, o papel do rearranjo PAX8-PPAR γ como marcador de malignidade não é consensual na literatura. Enquanto não for esclarecido se os casos de AFT com rearranjo PAX8-PPAR γ têm um prognóstico menos favorável e se tratam de carcinomas foliculares *in situ*, como interpretar os resultados em que este rearranjo está presente na PAAF? Além disso, sendo que este rearranjo tem uma frequência acumulativa de 30% dos casos de CFT, qual a conduta para os casos negativos?

OUTROS MARCADORES MOLECULARES

Outros candidatos a marcadores moleculares foram descritos. Entre estes, telomerase, HMG1 (Y), HBME-1, FN-1, CITED-1, TPO, CK19, GAL-3, RASSF1, RAS, PTEN e CAV1 (35-45). Até o momento, nenhum destes marcadores se mostrou eficiente em distinguir as lesões benignas das malignas e, portanto, não têm sido aplicados na prática clínica.

Sendo a carcinogênese um processo complexo e associado a múltiplas alterações genéticas, a identificação de um único marcador capaz de classificar todas as lesões com alta sensibilidade e especificidade é um grande desafio ou, talvez, inexequível. Por exemplo, GAL-3 foi capaz de distinguir AFT de CFT com boa sensibilidade e especificidade (37,46), mas quando testada em outras populações este dado não foi confirmado (47,48). Esta discrepância na literatura também ocorre para os demais marcadores. Assim, sugere-se que a associação entre os marcadores possa aumentar a sensibilidade e a especificidade.

Prasad e cols. testaram um painel de marcadores contendo GAL3, FN1, CITED1, HBME1 e CK19. Os autores sugerem que a combinação da expressão de dois dos marcadores GAL3, HBME1 e FN1 foi observada somente em carcinomas e, portanto, é capaz de diferenciar AFT de todos os carcinomas derivados das células foliculares com sensibilidade de 82% (GAL3 e FN1) e 62% (HBME1 e FN1). Vale a pena comentar que somente 6 casos de CFT foram investigados, sendo a grande maioria casos de CPT e VFCPT. Dos 6 casos de CFT, somente 3 foram positivos para dois destes marcadores. Além disso, quando incluídas na análise outras lesões benignas como bócio e hiperplasia, que também são fonte de erro no diagnóstico, estes marcadores mostraram baixa especificidade. Por exemplo, 55% dos bócios expressam GAL3, 31% expressam CK19, 7% expressam FN1 e 3% expressam HBME1. Ainda, a co-expressão de dois destes marcadores, declarada como específica de carcinomas, foi observada em 38% dos bócios.

Outro painel de anticorpos, que consiste em GAL3, TPO, CK19, KS e HBME1, foi testado em material obtido da PAAF e comparado com material conservado em parafina dos mesmos pacientes (49). Os autores propõem um protocolo para avaliação dos nódulos diagnosticados como PF, sendo a análise inicial a imunoistoquímica empregando o anticorpo para GAL3. Segundo o protocolo, todos os nódulos positivos devem ser encaminhados para cirurgia sem adicional avaliação imunoistoquímica. Os nódulos negativos para GAL3 devem ser investigados quanto à expressão de CK19 e HBME1. Em presença de um resultado negativo do segundo marcador, é sugerido que o médico acompanhe o paciente clinicamente, incluindo uma nova PAAF nos próximos 6-12 meses e reavaliação por imunoistoquímica. Eles acreditam que em caso de falso-negativo, o tratamento seria adiado por no máximo 12 meses. Em resultado positivo do segundo marcador, este deve ser encaminhado para cirurgia. Segundo os autores, GAL3 e HBME1 diferenciam as lesões foliculares convencionais (FTA e CFT), enquanto GAL3 e CK19 distinguem ACH de CCH com alta sensibilidade e especificidade. Os autores sugerem que a discrepância observada nos vários trabalhos provavelmente é decorrente da metodologia utilizada na imunoistoquímica (49).

Interessantemente, outros grupos têm associado a expressão de GAL3 principalmente a CPT, bócios e outras lesões benignas, mas raramente ao CFT. A expressão de HBME1 é positiva em casos de ACH (12%) e AFT (55%) (41,48,50-53).

Portanto, o protocolo de *screening* inicial com GAL3 (49) dever ser analisado com muita cautela, não só pelos casos falso-negativos de CFT, mas pelo grande

número falso-positivos. Mesmo que a positividade de GAL3 ou ainda HBME1 tenha sido focal nas lesões benignas, como alguns autores discutem, como será esta interpretação no material obtido da PAAF? Embora os autores acreditem que um atraso de 12 meses no tratamento não implique em conseqüências mais sérias para os pacientes, nos casos de CFT negativo para GAL3 que permanecem negativos e cujo tamanho do nódulo não varie muito, como será o tratamento? Doze meses de atraso no tratamento realmente não faz diferença?

Alterações associadas especificamente ao CPT, como a mutação no gene BRAF ou ainda rearranjos do tipo RET/PTC, também têm sido propostas para serem utilizadas no material obtido da PAAF numa tentativa de classificar os nódulos em benignos e malignos. Entretanto, a mutação V600E encontrada no exon 15 do gene BRAF ocorre exclusivamente na forma clássica de CPT (30–69%), dependendo da casuística estudada (54–56). Portanto, além de não ser identificado em todos os casos de CPT da forma clássica, não identifica as lesões mais comumente agrupadas como lesões foliculares que são as VFCPT. Se este marcador pode ser utilizado ou não como marcador de prognóstico, isso não será discutido nesta revisão.

DIAGNÓSTICO DE NÓDULOS COM PADRÃO FOLICULAR: NOVAS FERRAMENTAS

Tendo em vista o fato de que o desenvolvimento e a progressão dos tumores são decorrentes do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas no genoma das células somáticas tumorais e que essas alterações resultam em modulação da expressão gênica, a caracterização do perfil de expressão gênica dos tumores tem se tornado uma ferramenta importante para a descoberta de genes que estejam envolvidos na patogênese dos tumores e que possam ser utilizados com marcadores de diagnóstico, prognóstico ou ainda alvos terapêuticos.

Metodologias que utilizam sistemas fechados onde os genes são dispostos em arranjos gênicos como cDNA *microarray* e oligonucleotídeo *array* têm sido utilizadas para caracterizar a “assinatura molecular” e identificar genes diferencialmente expressos em cada uma das lesões comumente agrupadas como PF. Estas análises têm contribuído para aumentar a compreensão das diferenças moleculares existentes entre os diferentes subtipos de tumores foliculares e estão resumidas na tabela 1.

Nosso grupo utilizou *macroarray* com o objetivo de identificar novos marcadores. Entre os genes identificados, 5 foram selecionados para validação em diferentes subtipos de tumores da tiróide. A validação

dos achados mostrou que os marcadores eram diferencialmente expressos nos diferentes subtipos tumorais e podem contribuir para a compreensão da patogênese dos tumores da tiróide, não eram eficientes para serem utilizados como marcadores de diagnóstico (57).

Barden e cols. investigaram o perfil de expressão gênica de AFT e CFT e identificaram 105 genes diferencialmente expressos. Os autores sugerem a análise destes 105 genes candidatos em material obtido da PAAF (58).

Mazzanti e cols., empregando *microarray*, identificaram um grupo de 11 genes diferencialmente expressos entre as lesões benignas e malignas da tiróide (tabela 1). Dois modelos foram criados a partir da combinação da expressão destes 11 genes. O primeiro modelo é baseado na combinação de 10/11 genes e o segundo de 6/11 genes. Estes dois modelos foram utilizados para testar 10 amostras com diagnóstico desconhecido. Os resultados demonstraram que a combinação de 6 genes classificou corretamente 10/10 amostras (59). Posteriormente, o grupo investigou a expressão dos 6 genes selecionados por *microarray* através da metodologia de PCR em tempo real. Entretanto, três dos genes tiveram níveis semelhantes nas amostras benignas e malignas. Os autores discutem que mesmo com uma diferença pequena, estes genes são fundamentais para a correta classificação das amostras e devem ser incluídos na investigação. Somente com análises realizadas em outros laboratórios utilizando este painel de genes será possível dizer se este achado é reproduzível. Vale a pena salientar que, embora os autores discutiram que foram utilizadas amostras de subtipos comumente classificados como lesões foliculares, nestas duas análises não foram incluídos casos de CFT e ACH (60).

Um novo modelo de classificação, baseado nos níveis de expressão de três genes, permitiu que os autores discriminassem AFT de CFT. Os genes *PCSK2* e *CCDN2* apresentaram aumento de expressão em AFT, enquanto que *PLAB* tem aumento de expressão em CFT (61). Vale a pena comentar que o gene *PCSK2*, diferentemente do descrito como um dos marcadores expressos em AFT por Weber e cols. em 2005, havia sido identificado no nosso *screening* inicial como marcador de CFT. Entretanto, a validação demonstrou que *PCSK2* não foi capaz de diferenciar AFT de CFT, pois estava expresso em 30–40% dos casos de AFT e em 30–69% dos CFT (62).

Uma crítica comum às análises que utilizam *array* é a falta de concordância entre os diferentes estudos e as exaustivas listas de genes geradas. Como selecionar entre a lista de genes aqueles que têm potencial para serem usados como marcadores biológicos ou

Tabela 1. Resumo dos principais estudos que utilizaram *array* para identificar marcadores biológicos com aplicação no diagnóstico dos nódulos classificados como padrão folicular.

AUTORES	METODOLOGIA UTILIZADA	SCREENING INICIAL SUBTIPO (= n) ^a	MARCADORES IDENTIFICADOS	VALIDAÇÃO ^b	CONCLUSÃO
Arnaldo e cols. (57)	<i>Microarray</i> (1.807 transcritos)	ARO NPA WRO Tiróide normal	505 genes diferencialmente expressos entre as linhagens celulares e tiróide normal	<i>DCN, NPM1, DIO1, DIO2 e CH8</i>	Os marcadores mostraram-se diferencialmente expressos entre os diferentes subtipos tumorais mas não foram capazes de distinguir AFT e CFT
Barden e cols. (58)	Oligonucleotídeo <i>array</i> (>12.000)	AFT (12) CFT (7)	105 genes	<i>ADM, ENPP2, EMMPRIN, MET, TGFβR2</i>	Sugere o uso destes 105 marcadores em material obtido da PAAF
Mazzanti e cols. (59)	<i>Microarray</i> (10.000 transcritos)	NH (15) AFT (16) CPT (17) VFCPT (15)	<i>C21orf4, KIT, LSM7, SYNGR2, Hs.24183, Hs.296031, FAM13A1, C11orf8, KIAA1128, IMPACT e CDH1</i>		Gerou um modelo que utiliza a combinação de 6 genes para distinguir lesões benignas (NH e AFT) das malignas (CPT e VFCPT)
Rosen e cols. (60)		NH (11) AFT (15) CPT (9) VFCPT (12)	Utilização do modelo de Mazzanti e cols.	<i>C21orf4, KIT, LSM7, SYNGR2, Hs.24183, Hs.296031</i>	Diferencia CPT e VFCPT de AFT e NH das demais lesões com sensibilidade de 75% e especificidade de 100%
Finley e cols. (74)	<i>Microarray</i>	NH e AFT (14) CPT e VFCPT (21)	262 genes	<i>AM, TROP-2, MET, NRP2, Trefoil</i>	Diferencia CPT das demais lesões benignas com sensibilidade e especificidade de > 90%
Weber e cols. (61)	<i>Microarray</i> (22.283 transcritos)	AFT (12) CFT (12)	<i>CCDN2, PLAB e PCSK2</i>	<i>CCDN2, PLAB e PCSK2</i>	Diferencia AFT e CFT com sensibilidade de 100% e especificidade de 96,7%
Chevillard e cols.	<i>Microarray</i> (5.760 transcritos)	FTA (4) CFT (3) VFCPT (3) CPT (2)	43 genes diferencialmente expressos entre AFT e CFT 23 genes entre AFT e CPT 52 genes entre CFT e CPT	<i>DUSP5, CYR61 e SDC4</i>	Identificou um grupo de genes diferencialmente expressos em AFT e CFT e entre estas lesões e CPT
Griffith e cols. (63)	Meta-análise		<i>MET, TFF3, SERPINA1, EPS8, TIMP1, TGFA, QPCT, PROSP1, CRABP1, FN1, FCGBP e TPO</i>	Dez destes genes foram validados em diferentes estudos	Estes marcadores são candidatos a distinguir lesões benignas de malignas

^a NH (nódulo hiperplásico); AFT (adenoma folicular da tiróide); CPT (carcinoma papilífero da tiróide); VFCPT (variante folicular de carcinoma papilífero da tiróide); CFT (carcinoma folicular da tiróide).

^b Validação por RT-PCR (síntese de cDNA usando a enzima transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) ou imunistoquímica (IHC).

que têm importância na patogênese dos tumores da tiróide, daqueles genes cuja expressão é ilegítima? Com o objetivo de identificar genes cuja diferença de expressão era constante nos diferentes estudos, Griffith e cols. re-avaliaram as listas resultantes de 21 estudos publicados (63). Neste trabalho foram incluídos dois trabalhos publicados pelo nosso grupo e que utilizaram metodologias “highthroughput” (57,62).

Usando critérios de seleção bem definidos, eles identificaram 107 genes diferencialmente expressos e citados mais de uma vez, 18 foram reportados pelo menos duas vezes e doze citados pelo menos quatro vezes. Os autores descrevem uma lista de 12 genes, 10 dos quais foram validados por metodologias que investigam mRNA e/ou proteína (PCR em tempo real e/ou imunistoquímica e elisa) (tabela 1). Os autores

sugerem que estes genes candidatos poderão auxiliar no desenvolvimento de um painel de marcadores que terá suficiente sensibilidade e especificidade para diagnóstico dos tumores da tireóide. Uma análise utilizando estes marcadores em material obtido da PAAF é necessária para rejeitar ou aceitar tal hipótese. Entretanto, devido à quantidade de material obtido da PAAF e o custo do teste, o uso de 12 marcadores não é desejável. Outro fator que deve ser levado em consideração é que entre esses 12 marcadores, são listados genes cuja eficiência em distinguir lesões benignas das malignas é questionável como, por exemplo, TPO.

Ainda com relação ao perfil de expressão gênica, alguns autores têm investigado o perfil de expressão em uma nova classe de pequenos RNAs, também denominados microRNAs ou miRNAs, com o objetivo de identificar marcadores de diagnóstico e prognóstico. Esta classe de pequenos RNAs, que apesar de serem transcritos não codificam proteínas, exerce suas funções através da regulação da transcrição gênica (64). Recentemente, um grupo identificou um aumento de expressão dos microRNAs miR-197 e miR-346 em CFT. Os autores sugerem que esses microRNAs podem participar da progressão de AFT para CFT. Além disso, sugerem que estes ou ainda seus genes alvos possam ser candidatos a marcadores moleculares e alvos terapêuticos (65).

Além das ferramentas acima discutidas e que investigam o conjunto de RNA mensageiro que são expressas em um determinado tecido e que caracterizam o “transcriptoma”, a análise do “proteoma” oferece uma vantagem que é a detecção dos reais realizadores das funções moleculares, que são as proteínas. Um estudo piloto investigou o perfil de expressão das proteínas em biópsias de CPT comparado com o de tireóide normal. O estudo revelou alguns candidatos a marcadores moleculares de malignidade (66).

“BENCH-TO-BEDSIDE”, QUAIS SÃO AS PERSPECTIVAS?

Na ausência de um biomarcador que eficientemente pudesse resolver esse problema clínico que é diferenciar as lesões benignas das malignas, investigamos o perfil de expressão gênica de uma lesão benigna (AFT) e de uma lesão maligna (CFT). De posse das duas “assinaturas moleculares” poderíamos, então, compará-las e selecionar os melhores candidatos a marcadores de diagnóstico. Para essa investigação, optamos pela metodologia de SAGE. Esta metodologia foi escolhida porque, diversamente dos *microarrays* que se

caracterizam por serem sistemas fechados, os quais investigam os genes presentes em uma determinada plataforma, SAGE nos permitiria identificar e quantificar “todos os genes” expressos em uma determinada amostra. Para maiores detalhes da metodologia, consultar as referências (67,68).

A análise realizada usando SAGE e subsequente validação dos genes candidatos por PCR em tempo real permitiu identificar quatro novos marcadores, DDIT3, ARG2, ITM1 e C1orf24. A combinação da expressão destes marcadores permitiu diagnosticar corretamente 19 das 23 amostras analisadas (83%) (62).

Posterior validação por imunistoquímica, usando anticorpos comerciais para DDIT3 e ARG2, revelou que esses marcadores foram capazes de diferenciar AFT de CFT com alta especificidade (90,6%) e sensibilidade (85,2%) (62). Será que a associação com outros marcadores (ITM1 e C1orf24) poderia aumentar a sensibilidade e a especificidade? Anticorpos para ITM1 e C1orf24 (Niban) foram produzidos pelo nosso grupo e testados nas amostras de AFT e CFT previamente analisadas para DDIT3 e ARG2. Obtivemos uma sensibilidade de 100% para ITM1 e C1orf24 e especificidade de 89% (C1orf24) (tabela 2, figura 2) (69).

Vale a pena comentar que os falso-positivos eram 2 casos de adenomas de células de Hürthle e 1 adenoma atípico. A positividade era focal e, interessante, os 3 casos foram positivos para os 4 marcadores. Desta forma, a combinação dos 4 marcadores não aumentou a especificidade.

Com relação aos adenomas atípicos, alguns autores sugerem que alguns casos possam ser lesões intermediárias entre adenoma folicular e carcinoma indiferenciado, uma vez que mutações no gene supressor de tumor P53 foram identificadas em dois casos de adenoma atípico (70). Outros acreditam que os adenomas atípicos possam ser precursores de CFT ou CPT, pois apresentam características morfológicas e genéticas comuns a esses dois subtipos de carcinomas (71,72).

Como discutido na primeira seção deste manuscrito, o termo padrão folicular não se restringe só a AFT e CFT, mas pode incluir outras lesões.

Todos os marcadores mostraram alta sensibilidade e especificidade quando testados nas demais lesões benignas e malignas comumente agrupadas como padrão folicular (tabela 2, figura 2). Isoladamente, ITM1 teve maior especificidade e sensibilidade. Os falso-positivos foram 3 casos de nódulos hiperplásicos com células de Hürthle. Esses 3 casos também foram positivos para os demais marcadores (69). Embora os dados sugiram que ITM1 pode distinguir as lesões

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade para cada marcador.

Nome Marcador	CFT vs. AFT		Maligno vs. Benigno	
	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)
DDIT3	.85 [.68,.94]*	.90 [.76,.97]*	.90 [.80,.95]	.90 [.80,.95]
ARG2	.85 [.68,.94]*	.90 [.76,.97]*	.91 [.82,.96]	.88 [.78,.94]
ITM1	1.00 [.87,1.00]	.85 [.68,.94]	1.00 [.95,1.00]	.87 [.76,.93]
C1orf24	1.00 [.87,1.00]	.89 [.72,.96]	.97 [.90,.99]	.90 [.80,.95]

A sensibilidade e a especificidade foram calculadas conforme previamente descrito (69).

CFT, carcinoma folicular da tiróide; AFT, adenoma folicular da tiróide.

Benigno: Nódulos Hiperplásicos (n= 33) e adenoma folicular da tiróide (n= 27)

Maligno: carcinoma folicular da tiróide (n= 25), variante folicular de carcinoma papilífero da tiróide (n= 27) e carcinoma papilífero da tiróide (n= 15).

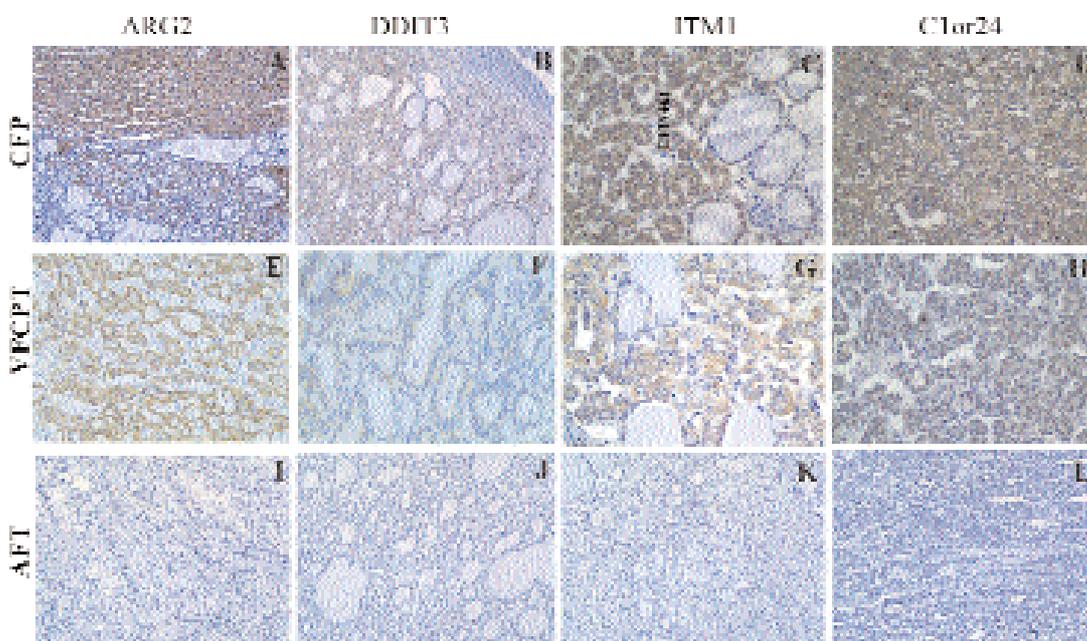


Figura 2. Imunohistoquímica empregando os anticorpos para ARG2, DDIT3, ITM1 e C1orf24 em secções de carcinoma folicular da tiróide (CFT), variante folicular de carcinoma papilífero (VFCPT) e adenoma folicular da tiróide (AFT). Os carcinomas (A-H) mostram forte reação positiva para todos os marcadores. Por outro lado, os adenomas (I-L) que são lesões benignas são negativos para todos os anticorpos. A ampliação original corresponde a 100X (A,B, I-L) e 400X (C-H).

benignas das malignas com alta sensibilidade e especificidade, a análise estatística demonstra que nenhum dos marcadores deve ser eliminado nas etapas posteriores do desenvolvimento de um teste pré-cirúrgico, uma vez que há sobreposição do intervalo de confiança (tabela 2).

Uma vez que desejávamos desenvolver um teste pré-cirúrgico barato e de fácil implementação na rotina laboratorial, estes marcadores foram testados em material obtido da PAAF de nódulos diagnosticados co-

mo padrão folicular utilizando a metodologia de imunocitoquímica. Entre os seis nódulos analisados, cinco casos foram submetidos a tireoidectomia. A comparação com os dados obtidos da análise histológica revelou que 5/5 casos foram corretamente classificados pelos marcadores (69).

Três meses após a nossa publicação validando os 4 marcadores nas várias lesões (69), um grupo japonês publicou um trabalho sugerindo que Niban (também denominado C1orf24) era um “novo marcador” tu-

moral em tiróide (73). Semelhante aos nossos achados, algumas lesões benignas com células de Hürthle foram focalmente positivas para a expressão de C1orf24. O grupo sugere que talvez Niban seja um marcador de progressão tumoral.

Com relação à expressão destes marcadores nos estudos de *array*, DDIT3 e ARG2 estavam entre os genes listados como diferencialmente expressos em CFT mas não foram validados (Barden, 2003 #7; Ying, 2003 #202). C1orf24 e ITM1 não foram identificados, muito provavelmente porque estes genes não estavam presentes nas plataformas usadas, deixando clara a vantagem de SAGE sobre as outras metodologias.

Até agora, as decisões de tratamento têm sido predominantemente baseadas na avaliação dos dados clínicos e citológicos do nódulo. Ao final das pesquisas, nossas e de outros grupos, esperamos ter marcadores tumorais que poderão ser investigados no material obtido de PAAF, que é um método minimamente invasivo, seguro e barato.

O uso de marcadores moleculares, associado à análise citológica, é uma nova concepção no diagnóstico dos nódulos tireoidianos. Com um diagnóstico pré-cirúrgico mais preciso teremos um tratamento adequando e, conseqüentemente, mais efetivo para os pacientes com câncer de tiróide.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos Flávia Latini, Gisele Oler, Liliane Arnaldi, Cléber Camacho, Cláudia Nakabashi, que contribuíram para a realização dos trabalhos aqui citados. Aos colegas e colaboradores Gregory Riggins, Rui Maciel, Rosana Delcelo, Jennifer Shoemaker e Vitor Andrade.

As pesquisas desenvolvidas pelo grupo e citadas aqui contaram com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (04/15288-0 e 05/60330-8) e NIH Grant CA113461. JMC é pesquisadora do CNPq e FADA-UNIFESP.

REFERÊNCIAS

1. Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med* 1997;126:226-31.
2. Topliss D. Thyroid incidentaloma: the ignorant in pursuit of the impalpable. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:18-20.
3. Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta Cytol* 1987;31:587-90.
4. Caraway NP, Sneige N, Samaan NA. Diagnostic pitfalls in thyroid fine-needle aspiration: a review of 394 cases. *Diagn Cytopathol* 1993;9:345-50.
5. Castro MR, Gharib H. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice, and pitfalls. *Endocr Pract* 2003;9:128-36.
6. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-4.
7. Suster S. Thyroid tumors with a follicular growth pattern: problems in differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:984-8.
8. Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL, et al. Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1336-40.
9. Baloch ZW, Gupta PK, Yu GH, Sack MJ, LiVolsi VA. Follicular variant of papillary carcinoma. Cytologic and histologic correlation. *Am J Clin Pathol* 1999;111:216-22.
10. Rago T, Di Coscio G, Basolo F, Scutari M, Elisei R, Berti P, et al. Combined clinical, thyroid ultrasound and cytological features help to predict thyroid malignancy in follicular and Hürthle cell thyroid lesions: results from a series of 505 consecutive patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:13-20.
11. Yang GC, Liebeskind D, Messina AV. Should cytopathologists stop reporting follicular neoplasms on fine-needle aspiration of the thyroid? *Cancer* 2003;99:69-74.
12. Jain M, Khan A, Patwardhan N, Reale F, Safran M. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study of histopathologic features and cytology results in 141 patients. *Endocr Pract* 2001;7:79-84.
13. LiVolsi VA, Baloch ZW. Follicular neoplasms of the thyroid: view, biases, and experiences. *Adv Anat Pathol* 2004;11:279-87.
14. Smith J, Cheifetz RE, Schneiderei N, Berean K, Thomson T. Can cytology accurately predict benign follicular nodules? *Am J Surg* 2005;189:592-5.
15. Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid* 2001;11:1147-51.
16. Logani S, Gupta PK, LiVolsi VA, Mandel S, Baloch ZW. Thyroid nodules with FNA cytology suspicious for follicular variant of papillary thyroid carcinoma: follow-up and management. *Diagn Cytopathol* 2000;23:380-5.
17. Deveci MS, Deveci G, LiVolsi VA, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular lesions of the thyroid. Diagnosis and follow-up. *Cytojournal* 2006;3:9.
18. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000;289:1357-60.
19. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1016-23.
20. Nakabashi CC, Guimarães GS, Michaluart P, Jr., Ward LS, Cerutti JM, Maciel RM. The expression of PAX8-PPAR γ rearrangements is not specific to follicular thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:280-2.
21. Herrmann MA, Hay ID, Bartelt DH, Jr., Ritland SR, Dahl RJ, Grant CS, et al. Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. *J Clin Invest* 1991;88:1596-604.
22. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR γ 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3947-52.
23. Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, et al. Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:354-7.
24. Reddi HV, Mclver B, Grebe SK, Eberhardt NL. The PAX8/PPAR γ oncogene in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007;148(3):932-5.
25. 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.

26. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPAR γ rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:213-20.
27. Castro P, Roque L, Magalhães J, Sobrinho-Simões M. A subset of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma harbors the PAX8-PPAR γ translocation. *Int J Surg Pathol* 2005;13:235-8.
28. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2318-26.
29. Sahin M, Allard BL, Yates M, Powell JG, Wang XL, Hay ID, et al. PPAR γ staining as a surrogate for PAX8/PPAR γ fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:463-8.
30. Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I, Sama I, Monaco C, Cammarota S, et al. Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4728-35.
31. Gregory Powell J, Wang X, Allard BL, Sahin M, Wang XL, Hay ID, et al. The PAX8/PPAR γ fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPAR γ inhibition. *Oncogene* 2004;23:3634-41.
32. Au AY, McBride C, Wilhelm KG, Jr., Koenig RJ, Speller B, Cheung L, et al. PAX8-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) disrupts normal PAX8 or PPAR γ transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology* 2006;147:367-76.
33. Giordano TJ, Au AY, Kuick R, Thomas DG, Rhodes DR, Wilhelm KG, Jr., et al. Delineation, functional validation, and bioinformatic evaluation of gene expression in thyroid follicular carcinomas with the PAX8-PPAR γ translocation. *Clin Cancer Res* 2006;12:1983-93.
34. Lacroix L, Lazar V, Michiels S, Ripoché H, Dessen P, Talbot M, et al. Follicular thyroid tumors with the PAX8-PPAR γ 1 rearrangement display characteristic genetic alterations. *Am J Pathol* 2005;167:223-31.
35. Saji M, Xydas S, Westra WH, Liang CK, Clark DP, Udelsman R, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in thyroid neoplasms. *Clin Cancer Res* 1999;5:1483-9.
36. Henry M, Zanelli E, Malthiery Y. Anti-human thyroid peroxidase and anti-human thyroglobulin antibodies present no cross-reactivity on recombinant peptides. *Clin Exp Immunol* 1991;86:478-82.
37. 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.
38. Schroder S, Wodzynski A, Padberg B. [Cytokeratin expression of benign and malignant epithelial thyroid gland tumors. An immunohistologic study of 154 neoplasms using 8 different monoclonal cytokeratin antibodies]. *Pathologie* 1996;17:425-32.
39. Chiappetta G, Tallini G, De Biasio MC, Manfioletti G, Martinez-Tello FJ, Pentimalli F, et al. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:4193-8.
40. Sack MJ, Astengo-Osuna C, Lin BT, Battifora H, LiVolsi VA. HBME-1 immunostaining in thyroid fine-needle aspirations: a useful marker in the diagnosis of carcinoma. *Mod Pathol* 1997;10:668-74.
41. Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la Chapelle A, Kloos RT. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 2005;18:48-57.
42. Lloyd RV. Distinguishing benign from malignant thyroid lesions: galectin 3 as the latest candidate. *Endocr Pathol* 2001;12:255-7.
43. Takano T, Matsuzuka F, Sumizaki H, Kuma K, Amino N. Rapid detection of specific messenger RNAs in thyroid carcinomas by reverse transcription-PCR with degenerate primers: specific expression of oncofetal fibronectin messenger RNA in papillary carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:3792-7.
44. Aldred MA, Ginn-Pease ME, Morrison CD, Popkie AP, Gimm O, Hoang-Vu C, et al. Caveolin-1 and caveolin-2, together with three bone morphogenetic protein-related genes, may encode novel tumor suppressors down-regulated in sporadic follicular thyroid carcinogenesis. *Cancer Res* 2003;63:2864-71.
45. Halachmi N, Halachmi S, Evron E, Cairns P, Okami K, Saji M, et al. Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;23:239-43.
46. Orlandi F, Saggiolato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:3015-20.
47. Cvejic D, Savin S, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Sinadinovic J. Immunohistochemical localization of galectin-3 in malignant and benign human thyroid tissue. *Anticancer Res* 1998;18:2637-41.
48. 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.
49. Saggiolato E, De Pompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, et al. Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:305-17.
50. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:338-42.
51. Scognamiglio T, Hyjek E, Kao J, Chen YT. Diagnostic usefulness of HBME1, galectin-3, CK19, and CITED1 and evaluation of their expression in encapsulated lesions with questionable features of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006;126:700-8.
52. Volante M, Bozzalla-Cassione F, DePompa R, Saggiolato E, Bartolazzi A, Orlandi F, et al. Galectin-3 and HBME-1 expression in oncocytic cell tumors of the thyroid. *Virchows Arch* 2004;445:183-8.
53. de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira Facuri F, Assumpção LV, Metzke K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology* 2005;47:391-401.
54. 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.
55. Oler G, Ebina KN, Michaluart P, Jr., Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:509-11.
56. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:625-7.
57. Arnaldi LA, Borra RC, Maciel RM, Cerutti JM. Gene expression profiles reveal that DCN, DIO1, and DIO2 are underexpressed in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 2005;15:210-21.
58. 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.
59. Mazzanti C, Zeiger MA, Costouros NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, et al. Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res* 2004;64:2898-903.
60. Rosen J, He M, Umbricht C, Alexander HR, Dackiw AP, Zeiger MA, et al. A six-gene model for differentiating benign from malignant thyroid tumors on the basis of gene expression. *Surgery* 2005;138:1050-6; discussion 1056-7.

61. Weber F, Shen L, Aldred MA, Morrison CD, Frilling A, Saji M, et al. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a 3-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2512-21.
62. Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RM, Peterson B, et al. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J Clin Invest* 2004;113:1234-42.
63. Griffith OL, Melck A, Jones SJ, Wiseman SM. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. *J Clin Oncol* 2006;24:5043-51.
64. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006;66:7390-4.
65. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3584-91.
66. Paron I, D'Ambrosio C, Scaloni A, Berlingieri MT, Pallante PL, Fusco A, et al. A differential proteomic approach to identify proteins associated with thyroid cell transformation. *J Mol Endocrinol* 2005;34:199-207.
67. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270:484-7.
68. Cerutti JM, Riggins GJ, de Souza SJ. What can digital transcript profiling reveal about human cancers? *Braz J Med Biol Res* 2003;36:975-85.
69. Cerutti JM, Latini FR, Nakabashi C, Delcelo R, Andrade VP, Amadei MJ, et al. Diagnosis of suspicious thyroid nodules using four protein biomarkers. *Clin Cancer Res* 2006;12:3311-8.
70. Tzen CY, Huang YW, Fu YS. Is atypical follicular adenoma of the thyroid a preinvasive malignancy? *Hum Pathol* 2003;34:666-9.
71. Sarquis MS, Weber F, Shen L, Broelsch CE, Jhiang SM, Zedeni J, et al. High frequency of loss of heterozygosity in imprinted, compared with nonimprinted, genomic regions in follicular thyroid carcinomas and atypical adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:262-9.
72. Vasko VV, Gaudart J, Allasia C, Savchenko V, Di Cristofaro J, Saji M, et al. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2004;151:779-86.
73. Matsumoto F, Fujii H, Abe M, Kajino K, Kobayashi T, Matsumoto T, et al. A novel tumor marker, Niban, is expressed in subsets of thyroid tumors and Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol* 2006;37:1592-600.
74. Finley DJ, Arora N, Zhu B, Gallagher L, Fahey TJ, 3rd. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3214-23.

Endereço para correspondência:

Janete Cerutti
Universidade Federal de São Paulo
Rua Pedro de Toledo 781, 12º andar
04039-032 São Paulo, SP
Fax: (11) 5084-5231
E-mail: cerutti-endo@pesquisa.epm.br