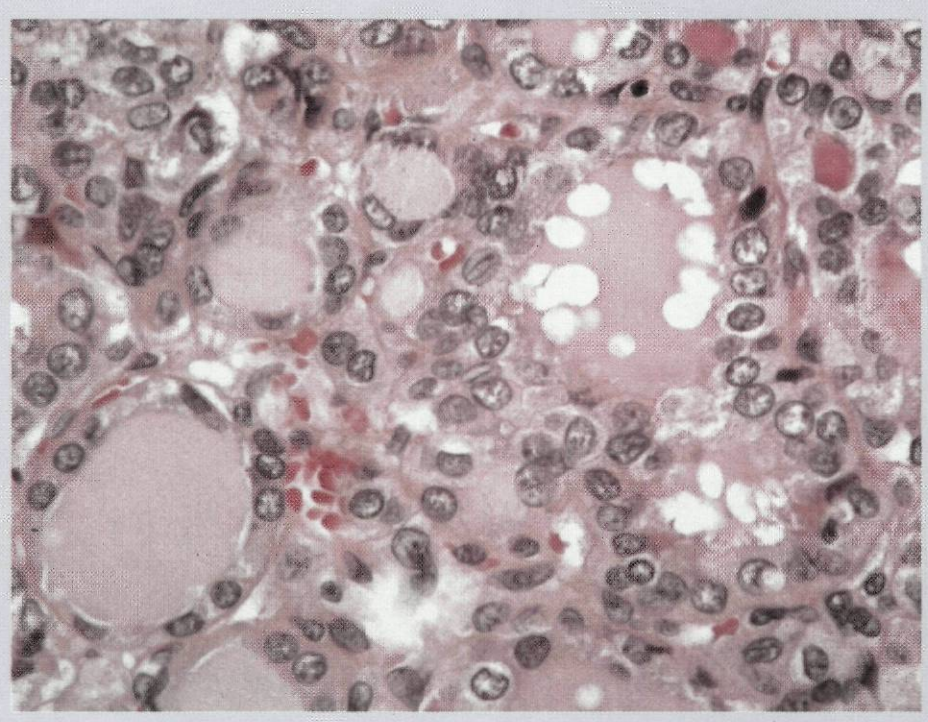
MESTRADO EM MEDICINA MOLECULAR DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

VARIANTE FOLICULAR DO CARCINOMA PAPILAR DA TIREÓIDE



João Manuel Marques Miranda Magalhães

PORTO
2004

M

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Artigo 48º, § 3 – A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação. (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto nº 19337, 29 de Janeiro de 1931)

ÍNDICE

1- AGRADECIMENTOS	5
2- INTRODUÇÃO	7
3- NOTA HISTÓRICA	10
4- HISTOLOGIA	11
5- CITOLOGIA	17
6- IMUNOHISTOQUÍMICA	20
7- BIOLOGIA MOLECULAR	35
7.1- CITOGENÉTICA	44
8- OBJECTIVOS	45
9- MATERIAL E MÉTODOS	46
10- RESULTADOS	48
11- DISCUSSÃO	57
12- CONCLUSÕES	63
13- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
14- RESUMO	72
15- SUMMARY	74

AGRADECIMENTOS

À Professora Elsa Fonseca, orientadora desta Tese de Mestrado, quero agradecer sinceramente a disponibilidade, a paciência e os conselhos que me deu ao longo deste percurso. A sua supervisão e confiança nas minhas capacidades foram fundamentais para levar este trabalho a "bom porto".

Ao Professor Manuel Sobrinho Simões, Coordenador do Curso de pós-graduação e Mestrado em Medicina Molecular, quero agradecer todas as sugestões que foi fazendo, a começar pela do tema desta tese. O contacto profissional constante consigo, quer no Hospital de São João quer no "grupo da tireóide" no IPATIMUP, tem sido um privilégio: o rigor, a exigência e, principalmente, o estímulo intelectual a que se é sujeito são permanentes e preciosos!

À Dr.ª Paula Silva, técnica de Anatomia Patológica da FMUP no IPATIMUP, agradeço o contributo fundamental no capítulo da imunohistoquímica e a facilidade de entendimento.

À Professora Clara Sambade quero agradecer o estímulo permanente e impiedoso para que eu tome definitivamente o "caminho menos percorrido", o único tolerável.

À Professora Fátima Carneiro, Directora do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, agradeço o incentivo e a disponibilização de condições para concluir esta tese.

Aos internos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João quero agradecer o apoio que me deram. Aqui incluo a Dr.ª Palmira Lima e o Dr. Paulo Dias, que já terminaram o internato. Ao João Cruz e ao Pedro Rodrigues Pereira e também ao Artur Oliveira e Silva, meus companheiros nesta "aventura", agradeço o incentivo e conselhos nas diversas fases deste trabalho. À Ana Filipa Capelinha e à Maria Isabel Exposito, minhas "irmãs gémeas" no internato de Anatomia Patológica queria agradecer duas coisas: em primeiro lugar o apoio profissional que me deram nas horas mais difíceis deste trabalho. Em segundo, e mais importante, agradeço o privilégio que é ser amigo de tais mulheres!

Aos restantes elementos do Serviço de Anatomia Patológica quero agradecer a paciência que tiveram comigo nas horas de maior sufoco. De entre estes gostaria de salientar os especialistas e, principalmente, a Dr.ª Otília Brandão. À Maria José Garcia agradeço a disponibilidade permanente para me ajudar.

Aos meus amigos e à minha família agradeço a paciência que tiveram para comigo, durante a fase de trabalho mais intenso! A paciência é uma virtude que eu tenho estimulado em muita gente, ultimamente...

Insolitamente, gostaria também de agradecer aos Rolling Stones (o grupo de música rock). De facto, e não sendo este o meu grupo preferido, ao longo da elaboração desta tese tem surgido muito frequentemente no meu espírito uma frase de uma música sua, cuja tradução aproximada é: "não se pode ter sempre aquilo que se quer, mas se se tentar, por vezes pode-se ter aquilo de que se precisa".

Finalmente, e em primeiro lugar, dedico esta tese à minha Mãe e ao meu Pai que, apesar de já não se encontrar entre nós, está sempre presente. A eles devo tudo.

INTRODUÇÃO

Os carcinomas da tireóide representam 1 a 1,5% de todos os cancros nos EUA, país onde surgem dezassete mil novos casos e há mil e duzentas mortes por ano devido a estes tumores (o que perfaz cerca de 60% do número total de mortes provocadas por tumores endócrinos malignos). Os carcinomas da tireóide são as neoplasias malignas endócrinas mais frequentes (cerca de 90% do total) e têm uma incidência anual de 0,5 a 10 casos por cem mil habitantes no mundo.[1] Tal como a patologia da tireóide em geral, os carcinomas desta glândula são, também, mais frequentes em mulheres. O prognóstico dos carcinomas bem diferenciados do epitélio folicular da tireóide - papilares e foliculares – é excelente: a sobrevida aos 5 anos é de 94% em mulheres e 90% em homens ;[1] aos 10 anos a sobrevida mantém-se em cerca de 90%.[2] Pelo contrário, o prognóstico dos carcinomas indiferenciados (anaplásicos) é muito mau: geralmente os doentes têm uma sobrevida inferior a um ano. O prognóstico dos carcinomas pouco diferenciados está "entre" o dos carcinomas bem diferenciados e o dos carcinomas anaplásicos.

Na glândula tireóide existem, também, os carcinomas medulares, cujo prognóstico é bom, se bem que não tanto como o dos carcinomas bem diferenciados do epitélio folicular. Estes tumores têm origem nas células C, que são as células neuroendócrinas produtoras de calcitonina, e, por isso, pertencem a um grupo de tumores diferente dos acima referidos.

Os carcinomas papilares (CP) são os mais frequentes da tireóide. Segundo a literatura, representam valores entre 54% e 80% do número total de carcinomas desta glândula.[3,4] São também a neoplasia maligna da tireóide mais frequente em todas as idades.[5] Os CP são 3 a 4 vezes mais frequentes em mulheres do que em homens e, apesar de poderem surgir em qualquer idade, geralmente aparecem antes dos 40 anos. Há, também, casos raros de CP congénito.[6]

Os CP metastizam habitualmente por via linfática. Mais raramente, no entanto, podem também ter invasão vascular venosa e, consequentemente, metástases à distância. O seu tamanho pode variar de poucos milímetros até um tumor que ocupa toda a glândula e estendendo-se para os tecidos envolventes. Apesar de o comportamento dos CP ser, geralmente, indolente, alguns tumores são mais agressivos, originando metástases à distância ou invadindo estruturas adjacentes no pescoço, p. ex. a traqueia, podendo ser fatais.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS),[2] o CP define-se como um "tumor epitelial maligno da tireóide com características nucleares próprias". Estas são: núcleos grandes, com forma ovóide, alongados e sobrepostos, clarificados, de aspecto esvaziado, e apresentando contornos irregulares, com fendas e pseudo-inclusões. A grande maioria dos CP é constituída por papilas e folículos em quantidades variáveis: cerca de 20-40% têm um predomínio de papilas (incluindo 14% contendo apenas

papilas),[7] cerca de 45% têm quantidades idênticas de papilas e folículos e 15-35% têm um predomínio de folículos.[8]

A esclerose intra-tumoral é outra característica muito útil no diagnóstico de CP (Isarankgul),[9] uma vez que está frequentemente presente nestas neoplasias e é rara no carcinoma folicular.

Os corpos psamomatosos são considerados praticamente patognomónicos de CP e são calcificações concêntricas, lamelares. Os corpos psamomatosos não estão presentes nos carcinomas foliculares.

As áreas de metaplasia pavimentosa, presentes em até 40% dos CP e a presença de infiltrado linfóide no estroma tumoral,[8] em cerca de 26% dos tumores, estão mais associados a CP.[10]

Para além dos núcleos, cujas características condicionam o diagnóstico, há outros aspectos morfológicos peculiares dos CP. Cerca de 60-70% dos CP são compostos predominantemente por estruturas papilares revestidas por células com as características nucleares acima referidas. Estes são os carcinomas papilares ditos "clássicos" (CPC). Há, no entanto CP formados predominantemente por outro tipo de estrutura (folicular, trabecular ou sólida), constituindo o grupo de "variantes" de CP. A OMS considera que um determinado padrão arquitectural deve estar presente em pelo menos 75% de um CP para poder ser considerado uma variante.[2]

São actualmente consideradas as seguintes variantes de CP:[2]

- Variante folicular do carcinoma papilar (VFCP): é a mais frequente, representando percentagens que, de acordo com as diferentes séries, variam entre 9% e 41% da totalidade dos CP.[10,11,12,13,14,15,16] Estes tumores são constituídos por "folículos de tamanho pequeno a médio, muitas vezes alongados e praticamente sem estruturas papilares".[2] A variante folicular difusa/multinodular, rara, faz parte deste grupo.[17,18] Cerca de 1/3 das VFCP são encapsuladas. Uma razão importante para a variação na frequência da VFCP poderá ser o uso de critérios diferentes para o diagnóstico da VFCP. Além disso, há uma certa tendência para a percentagem ser mais elevada em séries mais recentes, seja devido ao uso progressivamente mais correcto dos critérios de diagnóstico, ou seja pelo contrário, devido ao uso excessivo de um diagnóstico "em voga".

- Variante macrofolicular: é mais rara, correspondendo a 3,1% segundo Albores-Saavedra et al. ou a 8-21% segundo Fadda et al.[19,20,21] É composta predominante ou exclusivamente (mais de 50% de uma secção histológica) por macrofolículos – folículos com mais de 200μm de diâmetro. Esta variante é muitas vezes confundida com bócio colóide ou hiperplásico ou com o adenoma macrofolicular, o que torna óbvia a necessidade do seu reconhecimento pelo patologista.

- Variante de células altas: compreende cerca de 10% dos CP. Caracteriza-se pelo facto de ser constituída predominantemente por células cuja altura é igual ou maior do que o dobro da sua largura. Estas características têm que estar presentes em pelo menos 50% da totalidade do tumor. Esta variante tende a ocorrer em doentes mais idosos, do sexo masculino e tem um comportamento clínico mais agressivo do que o CPC.

- Variante oncocítica e/ou de células claras: compreende de 1 a 11% dos CP. Os tumores são formados por células com citoplasma oxifílico (geralmente devido à presença de mitocôndrias) ou clarificado.

- Variante tipo tumor de Warthin: surge num contexto de tireoidite de Hashimoto e caracteriza-se pela presença de abundante infiltrado linfo-plasmocitário no eixo das papilas.

- Variante esclerosante difusa: surge predominantemente em doentes jovens. Em cerca de metade dos casos, não há formação de nódulo bem definido, pelo que se pode confundir clinicamente com bócio ou tireoidite. É uma das formas agressivas de CP. A percentagem de doentes com metastização pulmonar é relativamente alta – 25%.

- Variante de células colunares: afecta geralmente indivíduos idosos. Apesar de ter arquitectura papilar, não se assemelha aos CPC. Pode apresentar um aspecto morfológico semelhante ao endométrio secretor, e a maior parte dos núcleos são hipercromáticos e não esvaziados. O seu comportamento clínico é mais agressivo do que o dos CPC.[22,23]

- Variante sólida: é mais frequente em crianças e em doentes com exposição prévia a radiação.

- Variante cribriforme-morular: é uma variante pouco comum, que aparece mais frequentemente associada a Polipose Adenomatosa Familiar.

Existem, ainda, outras variantes mais raras, cuja análise está fora do âmbito desta breve revisão.

É de referir, finalmente, que os CP com 1cm ou menos de maior dimensão – microcarcinomas - são considerados um grupo à parte, independentemente do seu padrão arquitectural. O seu prognóstico é ainda melhor do que o dos CP, em geral.

A presente dissertação centra-se na análise de diversos parâmetros da VFCP, pelo que a revisão bibliográfica que se segue procura restringir-se aos aspectos particulares desta variante.

NOTA HISTÓRICA

A existência de CP com um padrão de crescimento folicular foi referida pela primeira vez em 1953 por Crile e Hazard com a designação de "variante alveolar de carcinoma papilar".[24] Estes autores observaram núcleos com características idênticas aos das células das papilas dos CP, mas em células que se dispunham em estruturas foliculares ou alveolares. Crile e Hazard voltaram a descrever este achado dois anos depois, desta vez ilustrando-o.[25] Em 1958 Chesky et al. e em 1959 Welch et al. descreveram a "variante folicular de papiloma" (sendo "papiloma" a designação de CP),[24] constituída por quantidades variáveis de estruturas foliculares, tubulares, trabeculares e papilares. Na mesma altura, Frazell e Foote fizeram referência à coexistência de um componente folicular no CP que poderia ser, ou não, predominante.[26] Ainda em 1959, Beahrs e Woolner realçaram a variedade de padrões histológicos existentes nos CP, alguns quase exclusivamente constituídos por papilas e outros com estruturas predominantemente foliculares, com escassas papilas.[24]

Em 1960, Lindsay propôs o nome de "Variante Folicular do Carcinoma Papilar" (VFCP),[27] apesar de ainda o ter incluído no grupo dos carcinomas foliculares. Em 1961, Woolner enfatizou a ideia de o CP poder ter um padrão folicular, assim como outros padrões "não-papilares". Em 1964, foi novamente Lindsay que sugeriu a possibilidade de agrupar a VFCP com os CP típicos.[24] Em 1971 Franssila descreveu pormenorizadamente a morfologia dos carcinomas bem diferenciados da tireóide, tendo referido que alguns CP são compostos, predominantemente, por folículos.[24]

Em 1974, a Organização Mundial de Saúde aceitou este padrão na classificação das neoplasias da tireóide.[24] Finalmente, em 1977, Chen e Rosai defenderam o uso da terminologia proposta por Lindsay: carcinoma papilar, variante folicular.[28]

É particularmente importante notar que o fascículo de 1969 do AFIP sobre tumores da tireóide sugeria a classificação de qualquer carcinoma da tireóide constituído por pelo menos 50% de folículos como carcinoma folicular, sem atender às características nucleares.[29] Dado os fascículos do AFIP serem usados por muitos patologistas, por um lado, e serem uma espécie de classificação "paralela" à da OMS, por outro, pode ter surgido daqui parte da confusão em torno da VFCP.

HISTOLOGIA

Definição e controvérsias actuais

A necessidade de um diagnóstico anatomo-patológico correcto de VFCP reside em dois níveis diferentes. O primeiro, e logicamente mais importante, é a distinção entre uma lesão benigna e uma neoplasia maligna. São múltiplas as patologias benignas que entram neste diagnóstico diferencial, nomeadamente nódulos de bócio, nódulos adenomatosos e adenomas foliculares, bem como alguns casos de tireoidite linfocítica e lesões com células de Hürthle. Sendo o CP uma lesão maligna, há necessidade de um tratamento cirúrgico extenso, a tireoidectomia sub-total ou total. Ora o tratamento de uma lesão benigna não é tão agressivo como o de um carcinoma: não se administra iodo radiactivo e, geralmente, a cirurgia é menos extensa; pode até nem ser necessário o tratamento cirúrgico. É fundamental ter a noção de que o diagnóstico diferencial de todas estas lesões benignas é a VFCP e não o CP "clássico", na esmagadora maioria das vezes. Recordo nesta altura que o CP e, de uma maneira geral, todas as lesões da tireóide (diria mesmo todas as lesões em patologia), têm duas características anátomo-patológicas importantes: o padrão arquitectural e as características citológicas. Se a arquitectura papilar é quase exclusiva dos CP – mas não totalmente, pois há lesões hiperplásicas e adenomatosas com arquitectura papilar – já o padrão arquitectural folicular é quase universal. Aliás, o folículo é a unidade fundamental da glândula tireoideia. Portanto, numa lesão com arquitectura folicular as características citológicas, nomeadamente as nucleares, são fundamentais no diagnóstico diferencial. Todas as lesões benignas acima referidas possuem uma arquitectura predominantemente folicular, mas os núcleos das suas células não têm as características típicas de CP, mesmo nas áreas papilares, ao invés do que se verifica na VFCP.

O segundo nível de importância é o da distinção entre CP e carcinoma folicular. Se bem que o tratamento seja semelhante, o comportamento biológico e, em menor grau, o prognóstico destes dois carcinomas são diferentes, pelo que a individualização de cada um deles é crucial. Na distinção entre VFCP e carcinoma folicular surge o mesmo problema de semelhança arquitectural e, novamente, são as características nucleares que decidem o diagnóstico.

Há, ainda, outras lesões da tireóide com características que podem simular as do CP: alguns casos de doença de Graves, tumor trabecular hialinizante, restos ultimobranquiais, alterações pós-biopsia aspirativa e artefactos de fixação e processamento.

Em suma, o CP é o único tumor da tireóide que pode ser diagnosticado apenas pelas suas características nucleares.

O aspecto peculiar – esvaziamento e clarificação - do núcleo das células dos CP tem a "alcunha" de aspecto em "olhos de Orphan Annie". Nancy Warner, a primeira pessoa a aplicar esta expressão aos núcleos de CP, refere que Nathan Friedman tinha sugerido a

expressão "hot eyes" dada a semelhança desse aspecto com os olhos de uma actriz de cinema.[30] Este aspecto esvaziado é devido à marginação da cromatina junto à membrana nuclear, e pensa-se que seja um aspecto artefactual apenas visto em algumas condições técnicas do exame histológico. No entanto, este aspecto foi, também, observado em exame citológico. Para além de uma distribuição diferente da cromatina e das ribonucleoproteínas, há também deposição peri-nuclear de vimentina e desmina que contribui para a aparência nuclear.

Os núcleos de CP podem ser, também, alongados ou ovais, possuir fendas paralelas ao maior eixo nuclear e pseudo-inclusões nucleares de citoplasma. Estas duas estruturas são formadas por invaginações da membrana nuclear. Em microscopia electrónica confirma-se a presença de escassa heterocromatina, em pequenos grupos, de uma membrana nuclear com muitas invaginações e das pseudo-inclusões. Observam-se, também, escassos poros nucleares.

No recentíssimo volume da Organização Mundial de Saúde sobre a classificação dos tumores da tireóide, a definição de VFCP especifica que quase não se encontram papilas: "...with virtually no papillary structures".[2] No entanto, no parágrafo anterior do mesmo texto é referido que os tumores devem conter pelo menos 75% de uma determinada característica - padrão arquitectural (é este o caso da VFCP), tipo celular ou reacção estromal - para serem incluídos numa variante histológica específica.

A controvérsia sobre a definição exacta da VFCP já vem de longe e assenta em dois problemas específicos (desenvolvidos adiante). O primeiro tem que ver com o número de papilas permitido numa VFCP. O segundo, talvez mais complexo, diz respeito aos núcleos. Aqui se incluem aspectos qualitativos (quais são as características nucleares mínimas que permitem classificar um tumor como CP?) e, novamente, aspectos quantitativos (quantos núcleos com características de CP é necessário encontrar num nódulo para o englobar nessa categoria?). Espera-se que, desta vez, os critérios de consenso comecem a ser aplicados de uma maneira mais generalizada...

1º - Tendo este tumor uma arquitectura folicular, há uma razoável variedade de opiniões sobre qual a proporção de papilas que podem estar presentes sem que tal o classifique como um CPC. Há autores para quem a VFCP não tem nenhuma papila,[27,31,32] apenas estruturas foliculares, podendo ter cápsula ou não. Para De Micco, a VFCP tem arquitectura totalmente folicular e mais de 50% das células devem ter todas as características nucleares de CP.[33] Baloch considera que o diagnóstico de VFCP se deve fazer num tumor constituído por folículos, cujas células têm núcleos com características de CP,[34] não referindo especificamente a presença ou ausência de papilas. Para outros este é um tumor "quase só" constituído por folículos e geralmente com cápsula.[35] Para outros, ainda,[28,19,36] a VFCP é constituída só ou quase só por folículos. Goodell et al. referem que o tumor deve possuir as características nucleares de CPC, ser constituído só ou quase só por folículos, e não apresentar papilas.[37] Para Evans existem raras papilas na VFCP,[38] e nenhum dos tumores da sua série tem cápsula. Bell et al. definem a VFCP pela negativa:[15] só efectuam este diagnóstico na ausência de papilas bem formadas

encontradas facilmente; além disso consideram suficiente a presença de um foco com características nucleares típicas de CP para fazer o diagnóstico.

Alguns autores atrevem-se a quantificar a quantidade máxima de papilas que podem estar presentes nas VFCP: para Mesonero et al., Tielens et al. e Zidan et al. deve haver pelo menos 80% de folículos,[5,12,16] o que implica que possam estar presentes até 20% de papilas. Além disso, para Tielens et al. e para Zidan et al. devem estar presentes pelo menos duas das seguintes características nucleares típicas de CP: núcleos em "ground glass", esvaziados; núcleos com cromatina fina; sobreposição nuclear; e núcleos com fendas. Gallagher et al. são menos exigentes em relação à quantidade de folículos necessária: as VFCP da sua série têm pelo menos 2/3 de folículos na sua composição.[24] No mesmo artigo é feita referência a uma série da clínica Mayo, cujos tumores serão constituídos por pelo menos 70% de folículos. Para Fulciniti et al. o padrão folicular deve estar presente em pelo menos 70-80% do tumor.[39] Estes autores referem que se observa arquitectura folicular em cerca de 1/3 dos CP, em geral.

Baloch et al. introduzem, em 1999, uma "nuance" na definição: para além de considerarem VFCP apenas os tumores com padrão de crescimento exclusivamente folicular, referem uma VFCP "multifocal" constituída por 50 a 90% dos núcleos com características típicas de CP,[40] sendo um pouco diferente da VFCP habitual "difusa" em que cerca de 100% dos núcleos teriam estas características. Para estes autores, um tumor com uma quantidade menor de núcleos típicos seria, evidentemente, mais difícil de diagnosticar. A este propósito, Rosai et al. tinham proposto - no fascículo do AFIP sobre tumores da tireóide, em 1992 – que, se num tumor de arquitectura folicular se observassem focalmente núcleos típicos de CP e o resto do tumor fosse semelhante, este deveria ser classificado como VFCP.[36]

A definição da variante macrofolicular do CP é particularmente curiosa: tumores capsulados parcial ou totalmente, constituídos em mais de 50% da sua massa por macrofolículos – folículos com mais de 200μm de diâmetro – estando presentes no resto do tumor focos de VFCP "convencional".[19] É importante salientar que os macrofolículos podem, ou não, ter características citológicas de VFCP.

2º - Hoje em dia o problema no diagnóstico da VFCP reside, essencialmente, numa discussão qualitativa e quantitativa, isto é, já não é anormal chamar CP a um tumor sem papilas, porque o ponto-chave passou a ser as características nucleares. Há, no entanto, dificuldades em definir, de um ponto de vista quantitativo, a importância das alterações nucleares: qual a intensidade de clarificação a partir da qual o núcleo pode ser considerado como de CP? Apenas algum nível de hipocromasia é suficiente, ou é necessário o aspecto esvaziado? Qual o tamanho e qual a irregularidade nucleares a partir dos quais se pode diagnosticar CP? É necessário que existam fendas em muitos núcleos, e vincadas, ou basta em alguns? De um ponto de vista qualitativo, qual a alteração mais importante: o esvaziamento, o aumento de tamanho, as fendas, as pseudo-inclusões? Quantas destas características é necessário estarem presentes? E ainda do ponto de vista quantitativo: é suficiente que um ou poucos núcleos tenham fendas ou pseudo-inclusões para fazer o diagnóstico de VFCP, ou as alterações

nucleares devem ser vistas uniformemente em todo o nódulo? De tudo isto resulta que não existem critérios mínimos seguros para o diagnóstico de VFCP, tal como Renshaw e Gould afirmaram recentemente,[41] e que esta entidade permaneça controversa. Renshaw e Gould sugerem que há uma escala contínua de alterações nucleares entre benignidade e CP sem haver uma separação clara e, por isso, não é possível definir ou aplicar um limiar mínimo de diagnóstico para a VFCP. Como possíveis soluções para este problema são referidos: a realização de um estudo documentando a variabilidade inter-observador, uma conferência de consenso que defina critérios mínimos de diagnóstico reprodutíveis e, também, o uso de uma categoria de "indeterminado" nos casos em que não pareça haver uma distinção clara benigno/CP. Esta última solução, que Renshaw e Gould consideram útil e pragmática, já tinha sido proposta, em 2000, pelo grupo internacional de "patologistas de Chernobyl", liderado pelo Prof. D. Williams, com a criação da categoria "tumor bem diferenciado de potencial maligno incerto",[42] que incluiria tumores de arquitectura folicular, encapsulados, com alterações nucleares *minor* do tipo das observadas no CP típico.

Características clínico-patológicas

A média de idades dos doentes com VFCP é de 44 a 47 anos, semelhante à dos CPC, em que se situa entre 39 e 44 anos. Nos carcinomas foliculares os doentes são, em média, um pouco mais velhos – 41 a 55 anos. Além disso os CP podem surgir em qualquer idade, enquanto que os carcinomas foliculares aparecem predominantemente a partir da 5ª década de vida.[2]

A proporção relativa entre mulheres e homens com VFCP, é idêntica à dos CPC, variando de 2,8 a 4/1, havendo até um trabalho japonês que descreve uma relação de 7/1.[11] Nos carcinomas foliculares a desproporção é menor: 1 a 2/1.

A metastização ganglionar regional é muito característica dos CP em geral (VFCP e CPC). Está presente em cerca de 40-60% dos doentes na maioria das séries, elevando-se até cerca de 80% no trabalho japonês acima referido.[11] No entanto, alguns estudos apontam para uma percentagem menor na VFCP (0 a 22% segundo Baloch et al. e Tielens et al.).[12,40] A metastização ganglionar regional é muito rara nos carcinomas foliculares (0 a 5% na série descrita por Franssila).[7]

A metastização à distância (geralmente considerada por via sanguínea) ocorre em cerca de 7,1 a 25% dos doentes com VFCP e apenas em cerca de 2,7 a 10% nos CPC.[10,43] Contudo, aqui há alguma variabilidade entre estudos: alguns mostram percentagens semelhantes entre estes dois grupos de tumores, enquanto outros demonstram uma maior percentagem nas VFCP, o que as "aproximaria" um pouco dos carcinomas foliculares. No entanto, é de salientar que a percentagem de carcinomas foliculares com metástases à distância é bastante mais alta, chegando aos 72% numa série.[7]

A sobrevida é idêntica na VFCP e no CPC: acima de 90% aos 5 anos. Alguns autores referem uma sobrevida (actuarial) aos 21 anos de 86 e 82%, respectivamente para as VFCP e os CPC.[16] Nos carcinomas foliculares a sobrevida parece ser menor: há alguns estudos que apontam para valores de 85% aos 5 anos, enquanto outros apontam para cerca de 60% ou menos de sobrevida ao fim de 5 anos.[7] A discrepância entre estes números está relacionada com o tipo de carcinoma folicular considerado (minimamente ou extensamente invasor).

A multicentricidade/multifocalidade é, também, uma característica dos CP: cerca de 21,4% a 46% nas VFCP e 14,4% a 46% nos CPC.[10,43] Pelo contrário, é muito rara nos carcinomas foliculares, a rondar a inexistência. [7]

O tamanho tumoral é, nas VFCP, de cerca de 1,2 a 3,5cm em média, sendo que cerca de 25% destes tumores têm menos de 1cm de maior dimensão.[10] O tamanho dos CPC é ligeiramente maior ou semelhante, conforme os autores: 1,6 a 3,2cm; 7 a 10% destes tumores têm menos de 1cm de maior dimensão. Os carcinomas foliculares são em média, bastante maiores: 3,2 a 5 cm de maior dimensão.[7]

A extensão extra-tireoideia por contiguidade é relativamente frequente em CP: 14,2% a 16% nas VFCP e cerca de 5% a 34% nos CPC.[10] Neste caso também há uma certa aproximação das VFCP ao carcinoma folicular, na medida em que neste tumor a invasão extra-tireoideia é mais rara.[7]

A invasão vascular não é muito frequente nos CP: 7,1% a 8% nas VFCP e 5 a 14% nos CPC.[10,43] No entanto, há estudos que apontam para uma percentagem mais elevada nas VFCP, voltando a aproximá-las dos carcinomas foliculares.[44] Nestes, a frequência de invasão vascular é elevada (cerca de 68%),[7] sendo um dos critérios de diagnóstico.

São poucos os CP completamente encapsulados: cerca de 10% a 30% nas VFCP e 10 a 22% nos CPC.[2,10] Já os carcinomas foliculares são encapsulados, por definição.

Há algumas VFCP com um comportamento "híbrido" entre o CP e o carcinoma folicular.[45] Baloch et al. descreveram 5 casos de tumores pequenos (<1,5cm), completamente encapsulados, sem metástases ganglionares, nos quais foram descobertas metástases à distância (ósseas e/ou pulmonares) anos depois.[46] Estes casos foram todos observados em mulheres, com uma média de idades de 61,2 anos, tendo 3 deles sido, inicialmente, diagnosticados como adenomas foliculares.

As duas variantes referidas a seguir têm características bastante diferentes uma da outra. A variante macrofolicular apresenta baixa agressividade, sendo raros os casos com metastização ganglionar e extensão extra-tireoideia.[19] Aliás, este tumor tem um aspecto microscópico muito parecido com o de bócio ou adenoma macrofolicular, é constituído predominantemente por macrofolículos e é encapsulado. Já a variante difusa/multinodular (um sub-tipo de VFCP) tem um comportamento biológico mais agressivo, com percentagens de metastização ganglionar, extensão extra-tireoideia, multicentricidade, invasão vascular e de metastização à distância muito elevadas.[17,18]

Além disso aparece em doentes mais jovens: mulheres com uma média de idades de 26,8 anos.

Globalmente, o prognóstico do CP é pior em doentes com mais de 40-60 anos (embora este valor de "cutoff" varie de autor para autor). Em crianças, o prognóstico é melhor, apesar de terem uma frequência mais elevada de metástases ganglionares e à distância.[10] Características como a presença de metástases à distância, a extensão extra-tireoideia do tumor primário, ou diâmetro tumoral superior a 4cm (o valor de "cutoff" do diâmetro varia entre séries), também estão associados a pior prognóstico. Em termos globais, não há diferenças significativas de prognóstico entre o CPC e a VFCP.[10,16,28,47] Parece, ainda, haver um pior prognóstico nos homens, mas nem todos os estudos o mostram.

CITOLOGIA

A colheita de material para avaliação citológica é feita por biopsia aspirativa com agulha fina (BAAF), sem necessidade de recurso a cirurgia. Assim, sendo o exame citológico realizado antes do tratamento (é o exame que leva ao diagnóstico inicial), é com base no seu resultado que se decide sobre se se opera e que tipo de tratamento – cirúrgico e/ou médico – se vai fazer. Portanto a questão fundamental em citologia é diferente da colocada na histologia: a resposta mais importante a dar, nesta altura, é se o nódulo tireoideu é benigno (tumoral ou não) ou maligno e, se for tumoral, a qual dos dois grandes grupos de tumores da tireóide pertence: CP ou "tumor folicular". Os diagnósticos diferenciais do "tumor folicular" são a VFCP, o adenoma folicular/nódulo adenomatoso e o carcinoma folicular. Convém salientar, neste momento, que no exame citológico não se consegue distinguir adenoma de carcinoma folicular, dado que o diagnóstico diferencial entre estas duas lesões só pode ser feito mediante a observação da presença (ou ausência) de invasão da cápsula ou invasão vascular e, obviamente, o exame citológico não permite observar a cápsula e a relação desta com o tumor. Em citologia, não é fundamental efectuar um diagnóstico de VFCP, mas sim de CP, uma vez que a decisão terapêutica imediata é a mesma.[24] E ainda bem que assim é, visto que neste tipo de exame não é fácil fazer a distinção entre as variantes de CP.[48] Para o diagnóstico de VFCP, tal como na histologia, as características nucleares assumem uma importância decisiva, devendo ser de CP, enquanto que a sua arquitectura deverá ser predominantemente folicular. Tal como acontece com a histologia, não são pacíficos os critérios de diagnóstico de "alguns casos" de CP. De forma resumida, salientaremos algumas das características nos parágrafos seguintes.

Numa das primeiras descrições citológicas da VFCP não se fez este diagnóstico em nenhum dos três casos estudados: em dois foi feito o diagnóstico de CPC e no 3º caso o diagnóstico efectuado foi de tumor "folicular".[49] Estes casos demonstram a possibilidade de um erro de amostragem: podem ser aspiradas as poucas papilas que existam nestes tumores. Este é um problema que pode surgir na citologia e que resulta de se estar a observar uma quantidade de células tumorais muito menor do que na histologia. O terceiro caso ilustra outro aspecto do problema de amostragem, relacionado com o anterior: a possibilidade de nem todas as células terem características nucleares em qualidade e quantidade suficientes para que se possa fazer um diagnóstico de VFCP. No entanto, é importante reconhecer que nos três casos os diagnósticos feitos foram suficientes para que os doentes fossem submetidos a exérese da lesão, isto é, todos foram reconhecidos como sendo tumores; é este o objectivo principal do exame citológico.

Em algumas séries mais recentes manteve-se a dificuldade no diagnóstico da VFCP e mesmo de CP,[14] tendo esta dificuldade sido ainda maior nas variantes macrofoliculares, pela sua grande semelhança com lesões benignas. Também aqui, o diagnóstico "mínimo" de "tumor folicular" permitiu que o doente fosse operado, ainda que não com o diagnóstico "exacto".[37,50,51] Ainda não se consegue separar completamente a categoria das VFCP dos restantes "tumores foliculares", apesar do cuidado específico colocado na

tentativa de efectuar essa separação aquando do diagnóstico citológico.[50,51] Estes autores pensam que isto poderá ser devido à distribuição multifocal das características nucleares de CP, em alguns tumores.

As características nucleares são, obviamente, as mais importantes para o diagnóstico. A presença de pseudo-inclusões citoplasmáticas e, principalmente, de fendas nucleares, ocorre em quase todos os casos (75-93% para as fendas) e num número elevado de células.[13,48,52,53] A quantidade de células com estas características nucleares é importante, porque pode haver fendas e pseudo-inclusões em casos de nódulos colóides (6-17%), hiperplásicos/adenomatosos e também em adenomas (3-40%) e carcinomas foliculares (com ou sem células de Hürthle). Em todos estes casos elas são apenas focais.[13,48,52]

As grandes dimensões e a forma ovóide ou alongada dos núcleos, o tamanho pequeno do nucléolo e a hipocromasia são, também, características importantes no diagnóstico de VFCP, tal como no CPC.[5,37,39,54] O quadro citológico é, normalmente, hiper-celular, com sobreposição de núcleos. As estruturas predominantes são foliculares, sendo estas menos abundantes no CPC. Há, também, algumas estruturas rosetóides,[13] tubulares e trabeculares. O colóide, quando presente, forma massas arredondadas, densas, dentro dos folículos ou "soltas".[13] No CPC o colóide é mais escasso e tem um aspecto em "pastilha elástica", menos uniforme.[13,24] Na variante macrofolicular o colóide é mais abundante e pode ser fino ou espesso; as outras características são idênticas às da VFCP "comum".[5,55,56,57] No entanto, alguns autores consideram mais difícil o diagnóstico da variante macrofolicular devido à escassez dos aspectos típicos de CP.[21]

É importante sublinhar, de novo, que as características nucleares de CP são de tal maneira específicas que, em exames citológicos onde estejam presentes, ainda que focalmente, a percentagem de casos em que a histologia confirma o diagnóstico de CP é alta: 75% segundo Logani et al.[58] Renshaw et al. demonstraram até que a presença de características nucleares de CP em menos de 20 células (!), na citologia, se associa a uma percentagem de VFCP de 54% na histologia.[54]
A presença de corpos psamomatosos é mais frequente no CPC do que na VFCP.[55,58] Estas estruturas, no entanto, estão frequentemente ausentes no exame citológico.[13,37] A presença de células tumorais isoladas (mais no CPC), em agregados sinciciais e em folhetos, bem como de células gigantes multinucleadas de tipo histiocítico, pode ser observada em todas as variantes, com frequência variável.[13,24,59,60] As células gigantes multinucleadas também podem estar presentes em patologia tireoideia não-tumoral, p. ex., nas tireoidites de Hashimoto e granulomatosa, mas não são observadas em adenomas foliculares.[61] Os vacúolos marginais estão presentes em 44-50% das VFCP e não parecem estar presentes nos CPC. Não são específicos, no entanto, pois a sua presença é comum também em lesões foliculares benignas.[53]

O diagnóstico de VFCP num nódulo hiperfuncionante é extremamente difícil, porque neste pode haver aspectos semelhantes aos do CP, nomeadamente clarificação focal da cromatina, alongamento nuclear e presença focal de fendas. No entanto estes nódulos

são raros (0,9 a 9% do total da patologia tireoideia), sendo mais raro ainda que um nódulo hiperfuncionante corresponda a um carcinoma.[62]

A precisão diagnóstica da BAAF no reconhecimento "específico" da VFCP não é total, como foi referido acima. A utilização complementar do exame extemporâneo pode aumentar o grau de precisão diagnóstica. Não há, no entanto, unanimidade quanto a este ponto. Tielens et al. estudaram doentes com diagnóstico histológico confirmado de VFCP que foram submetidos a BAAF e, posteriormente, a exame extemporâneo histológico. A boa sensibilidade da BAAF no diagnóstico de VFCP – cerca de 75% - baixou muito, para apenas 27% no exame extemporâneo.[12] A justificação para esta diferença residirá, por um lado, na perda da nitidez das características nucleares devida aos artefactos inerentes à congelação do tecido durante o exame extemporâneo. Por outro lado, a presença frequente de cápsula fibrosa e a estrutura folicular do tumor também contribuirão para esta menor sensibilidade, pela semelhança com o adenoma e o carcinoma folicular. Convém, no entanto, salientar que Tielens et al. consideraram os diagnósticos citológicos de "suspeito de VFCP" como verdadeiros positivos, o que contribuiu seguramente para o aumento da "boa sensibilidade" verificada por estes autores. Já Lin et al. consideraram apenas os casos com diagnóstico citológico seguro de VFCP como verdadeiros positivos,[14] tendo obtido baixa sensibilidade na identificação da VFCP quer com a BAAF, quer com o exame extemporâneo histológico - 25% e 29%, respectivamente. Pelo contrário, no CPC estes valores foram de 74% e 87%. Nair et al. obtiveram ainda menor sensibilidade na identificação de VFCP em biopsia aspirativa: apenas 13,6%.[4]

Uma maneira de evitar o possível erro de diagnóstico devido à perda da nitidez das características nucleares resultante da congelação necessária ao exame extemporâneo histológico é o uso simultâneo do exame extemporâneo citológico, utilizando "imprint" ou raspado do nódulo tumoral.[5,63] Este procedimento duplo tem a vantagem da preservação das características nucleares e arquitecturais fundamentais para a distinção do CP, principalmente em lesões de padrão folicular.

IMUNOHISTOQUÍMICA

Como corolário do que foi discutido nos capítulos anteriores, pode-se dizer que o diagnóstico morfológico da VFCP é, por vezes, pouco preciso ou mesmo subjectivo. Em consequência disso houve - e há – necessidade de encontrar métodos e marcadores mais objectivos que permitam uma maior segurança no diagnóstico. A imunohistoquímica é o meio auxiliar que despertou mais interesse, muito provavelmente pela facilidade com que pode ser usada pelo patologista. De facto, há muitos trabalhos publicados em que se procurou encontrar "marcadores" imunohistoquímicos que, isoladamente ou de forma combinada, permitam reconhecer a VFCP. Nas páginas seguintes resumiremos alguns dos dados mais relevantes das publicações nesta área.

Citoqueratinas

As citoqueratinas (CKs) normalmente presentes no epitélio folicular da tireóide normal são as CKs 7,8 e 18 – citoqueratinas de baixo peso molecular, ditas de "epitélios simples e glandulares". Estas citoqueratinas estão também presentes em todas as lesões papilares e foliculares da tireóide.

A CK19 é uma queratina com peso molecular baixo – 40 KDa – e está presente na maior parte dos epitélios simples, com excepção do fígado e dos túbulos renais (e respectivos carcinomas). Em epitélios complexos e estratificados a sua expressão é focal ou restringida às células basais. No epitélio folicular da tireóide normal, a expressão de CK 19 é ténue ou está ausente. A sua marcação é citoplasmática, por vezes com reforço junto à membrana celular. O aumento da sua expressão não é específico de malignidade. No entanto, todos os trabalhos efectuados com a CK19 apontam para a sua relativa especificidade no "reconhecimento" do CP.

Schelfhout et al. descreveram marcação com a CK19 em mais de 95% das células nos 12 CPC que estudaram.[64] Não é claro se alguns destes casos foram VFCP. Em carcinomas e adenomas foliculares, nódulos colóides e tireóide normal a marcação foi sempre em menos de 50% das células.

Miettinen et al. observaram expressão forte e difusa da CK19 em quase todos os CP (137) que estudaram, enquanto que os casos de hiperplasia papilífera mostraram apenas expressão esporádica, em escassas células.[65] Neste estudo não foi individualizado o grupo das VFCP. Na maioria dos adenomas foliculares foi detectada expressão de CK19, mas geralmente em menos de 10% das células, e com intensidade menor que a dos CP. Quase metade dos carcinomas foliculares apresentou expressão forte em, pelo menos, 50% das células. A positividade observada em todos os casos de bócio e, também, de tireoidite linfocítica, foi variável de focal a multifocal, concentrada em

áreas "atróficas" e de metaplasia pavimentosa. Nos tumores de células de Hürthle a marcação foi, também, variável e semelhante para os casos benignos e malignos. O estudo efectuado com outras citoqueratinas (CKs 5/6, 10, 16 e 17) foi negativo nestes tumores. É de referir, a este propósito, que nas lesões de células de Hürthle é necessário cuidado na leitura da marcação imunohistoquímica devido ao artefacto resultante da avidez pela avidina, provavelmente devida à quantidade de biotina endógena.

Baloch et al. obtiveram resultados idênticos no grupo de CP mas nas VFCP (26 casos) a intensidade foi menor em áreas sem núcleos típicos de CP.[40] Estes autores descreveram expressão focal de CK19 no parênquima imediatamente adjacente a quase todas as VFCP e ausência de expressão nos folículos mais afastados. Nenhuma das outras lesões estudadas (carcinomas e adenomas foliculares/nódulos adenomatosos) teve expressão de CK19. Estes autores observaram, ainda, expressão focal de citoqueratina 19 em parênquima tireoideu "normal" em casos de CP com focos de tireoidite linfocítica. Foi, também, observada positividade em áreas de metaplasia pavimentosa e em restos ultimobranquiais. Nesta série foi também estudada a expressão de CK20, que é uma CK de baixo peso molecular presente em alguns epitélios simples. Foi observada imunorreactividade para a CK20 nos CP (incluindo as VFCP), mas em menos casos, menos difusamente e com menor intensidade do que a CK 19.

Sahoo et al. observaram expressão de CK19 nos 15 CP (incluíndo 10 VFCP) que estudaram.[66] Apenas um caso de VFCP teve menos de 25% das células positivas; em todos os outros foram positivas mais de 75% das células. Todos os adenomas foliculares foram, também, positivos, variando a quantidade de células imunorreactivas entre menos de 5% até 75% do total das células. A marcação para CK19 nos adenomas foliculares foi menos intensa do que nos CP. Tal como Baloch et al.,[40] estes autores observaram positividade para a CK19 no parênquima adjacente aos tumores, nos dois grupos.

Fonseca et al. também observaram marcação para CK19 nos 41 CP que estudaram (incluindo 9 VFCP).[67] Esta marcação foi difusa em todos os casos, excepto num, em que foi multifocal. Estes autores também observaram positividade nos 10 carcinomas foliculares estudados, um pouco menos intensa e difusa. Na tireóide normal em casos de tireoidite linfocítica a marcação foi ainda mais ténue, ligeiramente mais intensa na tireoidite.

Cheung et al. estudaram 138 CP e encontraram positividade difusa para a CK19 em 80% (43/54) dos CPC estudados,[68] e em 57% (48/84) das VFCP. Em 20% dos nódulos hiperplásicos observaram marcação focal para CK19 e em 17% dos adenomas foliculares observaram positividade focal ou, raramente, difusa.

Cerilli et al. detectaram expressão forte e difusa de CK19 em todos os casos de CP (30, incluindo 12 VFCP) que estudaram.[69] Apenas num CPC a expressão foi forte e multifocal (i.e., não difusa), e numa VFCP foi negativa. Na maioria dos casos de adenoma e carcinoma folicular (incluindo de Hürthle) a CK19 também foi positiva, mas geralmente mais fraca e focal.

Beesley et al. observaram expressão de CK19 em todos os casos (26) de CP da sua série.[70] Na maioria dos casos (incluindo as 4 VFCP) a marcação foi forte e difusa. Alguns casos de bócio, de adenoma e de carcinoma folicular foram também imunorreactivos, com marcação por vezes forte e difusa. As áreas de hiperplasia papilífera presentes em adenomas foliculares e nódulos de bócio foram negativas para a CK19.

Os resultados obtidos por Raphael et al. com a citoqueratina 19 são idênticos:[71] 16 de 18 CP (incluindo 2 VFCP) tiveram marcação difusa, enquanto que quase todas as outras lesões (adenomas e carcinomas foliculares e nódulos hiperplásicos) não. Note-se, no entanto, que este estudo foi feito em material congelado, ao contrário dos anteriores.

As citoqueratinas de epitélios estratificados (CKs 5/6, 16 e 17) têm sido detectadas focalmente em CP, nomeadamente em células localizadas em estroma desmoplásico e em áreas de metaplasia pavimentosa. Geralmente estão ausentes nas outras lesões e em tireóide normal.[40,65] Portanto elas são específicas, mas pouco sensíveis.

Raphael et al., no estudo acima citado,[71] encontraram expressão difusa de citoqueratinas de alto peso molecular (CKs 1, 5, 10 e 11) em 17 de 21 CP (incluindo 2 VFCP), enquanto que nenhuma outra lesão teve mais do que 33% das células positivas; estes resultados são um pouco diferentes dos acima referidos por outros autores. Note-se, mais uma vez, que este estudo foi feito em material congelado, ao contrário dos anteriores.

Fonseca et al., no estudo acima referido,[67] também estudaram a expressão de CK de epitélios estratificados. Estes autores verificaram que as CK 5/6 e 13 foram expressas em 27 e 14 casos de CP (de 41), respectivamente. Não se observou positividade para estas CK em nenhuma das outras lesões estudadas nem em tireóide normal.

CD10

O CD10 (ou endopeptidase neutra 24.11) é uma metaloproteinase ligada à membrana celular que regula a actividade biológica de substratos peptídicos (p. ex. peptídeos opióides, angiotensina I e II, bradicinina, substância P, factor auricular natriurético) ao reduzir a sua concentração e, consequentemente, a sua bio-disponibilidade. A expressão de CD10, tal como a de outros membros da família das metaloproteinases, pode ser induzida por factores solúveis (p. ex. TNF e GM-CSF). Outros elementos da família do CD10 (proteínas integrais de membrana do tipo II) são a enzima conversora da endotelina e a proteína do grupo sanguíneo Kell. A sua expressão em células do sistema hematopoiético é útil no diagnóstico de algumas leucemias e linfomas. O CD10 é, desde há longo tempo, usado como marcador do antigénio comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA – é sinónimo).[72] As células da "bordadura em escova" do intestino

delgado, as microvilosidades dos túbulos renais, as células mioepiteliais da mama, granulócitos, precursores linfóides precoces, e alguns linfócitos dos centros germinativos de folículos linfóides também expressam o CD10. Nas células do sistema hematopoiético o CD10 é um marcador de diferenciação e parece estar envolvido, também, na regulação da linfopoiese B, activação T e na regulação de resposta inflamatória mediada por peptídeos. A sua função na superfície do epitélio dos túbulos renais proximais e do intestino delgado é a participação na fase final da hidrólise de peptídeos.[73] No pulmão o CD10 é expresso durante a vida fetal. Em adultos com carcinomas de células pequenas a sua expressão está diminuída, concomitantemente com o aumento da expressão de peptídeos de tipo bombesina. Estes peptídeos são degradados pelo CD10. Pensa-se, ainda, que o CD10 também regula a proliferação celular.[73] Pode também observar-se expressão de CD10 em tumores não hematológicos: carcinoma hepatocelular, carcinoma renal, carcinoma da mama, adenocarcinomas gástricos e colo-rectais e em sarcomas do estroma endometrial. Na tireóide, a presença de CD10 tinha sido descrita apenas em linfomas. No entanto, Tomoda et al. observaram, em 2003, expressão de CD10 em 7/9 VFCP e em 8/10 carcinomas foliculares, com intensidade variável, mais intensa e mais frequente na periferia e na frente invasora dos tumores.[74] Em contraste, nos CPC, adenomas foliculares e bócios adenomatosos não foi observada expressão de CD10. O parênquima normal também não mostrou marcação em nenhum caso.

Galectina-3

A galectina-3 (GBP35, L-35 ou Mac-2) é uma proteína de cerca de 30 kDa de peso, da família das lectinas com afinidade para β-galactosídeos. Esta proteína é expressa predominantemente no citoplasma, mas também no núcleo e na superfície celular, quer em células epiteliais quer em células do sistema imunológico, nomeadamente polimorfonucleares e macrófagos. Pode também estar presente em células endoteliais. Para além do seu papel na embriogénese, as galectinas estão envolvidas em interacções célula-a-célula, célula-matriz e na regulação do crescimento, transformação e metastização em alguns tumores (p. ex. mamários e colo-rectais). Apesar de ainda se desconhecer o seu papel exacto, sabe-se que as galectinas também estão envolvidas em processos inflamatórios e de apoptose. Num modelo de carcinoma da mama a sobre-expressão de galectina-3 protege as células da apoptose induzida pela perda de ancoragem. A sua sobre-expressão também está associada a invasão e metastização. Dado que a expressão da galectina-3 parece ser diferente em lesões benignas e malignas da tireóide e outros órgãos, tais como mama, cólon, estômago e glândulas salivares, ela poderá ser mais um marcador útil na distinção benigno/maligno. A marcação imunohistoquímica da galectina-3 é citoplasmática, embora por vezes também se observe reactividade nuclear. Esta molécula não é expressa em tireóide normal.

Fernandez et al. observaram marcação para a galectina-3 em 18 CP (incluindo 2 VFCP),[75] habitualmente difusa, mas focal e intensa numa das VFCP. Observaram,

também, positividade em 4/8 carcinomas foliculares, 2/3 carcinomas pouco diferenciados, 5/5 carcinomas anaplásicos e 3/6 carcinomas medulares. Todas as lesões benignas (8 adenomas foliculares e 8 nódulos hiperplásicos) e a tireóide normal foram negativas. Em áreas de inflamação crónica foi observada positividade focal. Neste estudo o anticorpo usado foi policlonal. É de referir que a positividade para a laminina – o ligando da galectina-3 – não se correlacionou com a distribuição da galectina-3. Os autores observaram, ainda, positividade para a galectina-3 noutras células da tireóide: endoteliais (como referido acima), musculares lisas, nervosas e inflamatórias (PMN e macrófagos). Cvejic et al. descreveram positividade moderada a forte para galectina-3 em 18 de 20 CP.[76] Os carcinomas foliculares foram mais fracamente ou menos frequentemente positivos. De 14 adenomas foliculares, cinco tiveram expressão de galectina-3, sendo moderada a forte em alguns.

Num estudo multicêntrico, publicado em 2001, Bartolazzi et al. estudaram a expressão de galectina-3 retrospectiva e prospectivamente.[77] Neste trabalho o grupo das VFCP não foi individualizado. No braço retrospectivo do estudo, apenas 7 de 287 peças de ressecção de patologia benigna tiveram expressão de galectina-3, das quais 5 foram adenomas foliculares onde se observou positividade em menos de 20% das células. Nos outros dois casos a marcação foi detectada em associação com tireoidite linfocítica. Dos 311 casos com diagnóstico histológico de malignidade estudados retrospectivamente (por imunohistoquímica em cortes histológicos), 94,2% foram positivos para a galectina-3. Entre os casos negativos contaram-se: 7/20 carcinomas pouco diferenciados, 6/201 CP e 3/40 carcinomas foliculares minimamente invasores. Os valores de sensibilidade e de especificidade foram ligeiramente menores, quando o estudo imunohistoquímico foi foi feito em "cell-block", retrospectivamente. No ramo prospectivo foram estudadas biopsias aspirativas de 226 doentes submetidos posteriormente a cirurgia. Em 136 doentes o diagnóstico foi feito apenas com o exame citológico, incluindo 10/12 CP. Nos outros 90 o resultado do exame citológico não foi conclusivo. Contudo, complementando este exame com a galectina-3, foram detectados todos os carcinomas deste grupo, incluindo 5 carcinomas foliculares minimamente invasores. Apenas 3 de 192 casos com diagnóstico histológico de benignidade tiveram expressão de galectina-3 no exame citológico. Neste ramo do estudo, a sensibilidade da galectina-3 na detecção de malignidade foi de 100%, a especificidade foi de 98%, o valor preditivo positivo foi de 92%, o valor preditivo negativo foi de 100% e a precisão foi de 99%.

Herrmann et al. encontraram expressão fraca a moderada de galectina-3 em 5/15 casos de VFCP, tendo os outros 10 sido negativos.[78] A marcação foi forte na maior parte dos restantes CP e focal/fraca a forte em alguns carcinomas de células de Hürthle. Em vários tumores com expressão de galectina-3, esta foi mais forte na "frente invasora" do que na região central do tumor. Em adenomas e carcinomas foliculares a expressão de galectina-3 foi negativa a focal/fraca. Nos casos de bócio não se observou reactividade. Foi observada marcação focal e fraca em epitélio folicular reactivo, p. ex., em relação com focos de tireoidite linfocítica crónica. Neste estudo, Herrmann et al. usaram um anticorpo monoclonal comercial "contra" a galectina-3 humana. Em quase todos os trabalhos anteriores, tinham sido usados anticorpos de baixo título, não comercializados,

que reagem com a galectina-3 não humana; estes anticorpos têm reacção cruzada com a galectina-3 humana.[79,80,81] Num trabalho, foi utilizado um anticorpo policlonal contra a proteína humana.[75] Herrmann et al. usaram, também, um sistema de detecção da imuno-reactividade com digoxigenina,[78] paralelamente ao sistema habitual, com biotina, para ver a importância da reactividade endógena de tipo biotina que surge em várias lesões tireoideias. Assim, nos controlos negativos, a digoxigenina não mostrou "marcação", enquanto que a biotina (mesmo com pré-tratamento com avidina e biotina) "marcou" alguns CP, células de Hürthle reactivas e todos os tumores de células de Hürthle fortemente; os autores sugerem o uso de outro sistema de detecção da imuno-reactividade para evitar falsos-positivos.

Beesley et al. (2002) observaram positividade forte e difusa para a galectina-3 na maioria dos CP da sua série (26), que incluiu 3 VFCP positivos.[70] Quatro casos, incluindo uma VFCP, foram negativos. Todos os carcinomas foliculares foram positivos, também com marcação difusa moderada e, focalmente, forte. A expressão de galectina-3 foi também mais intensa na "frente" invasora. Os 2 adenomas foliculares positivos para galectina-3 foram-no focalmente, um deles fraca e o outro fortemente. Dos 3 bócios multinodulares positivos para galectina-3, um foi-o difusa e fortemente, os outros dois foram moderadamente positivos. É importante referir que as áreas de hiperplasia papilífera observadas quer em adenomas foliculares quer em bócios foram negativas para galectina-3. Na tireóide normal adjacente aos nódulos, presente em 61 casos, não se observou positividade para a galectina-3, ou foram observadas apenas raras células positivas. Os resultados obtidos por Beesley et al. revelam algumas diferenças em relação aos estudos anteriormente citados, nomeadamente o facto de, neste trabalho, a expressão de galectina-3 em CP não ter sido tão intensa nem tão consistente como em descrições anteriores. Outra diferença reside no facto de até aqui não ter sido descrita positividade em tireóide normal – agora é descrita em células raras. Já nos carcinomas foliculares há uma maior semelhança com vários dados anteriores que apontavam no sentido de uma expressão intensa e em quase todos os casos. Os resultados observados em adenomas foliculares são também semelhantes aos anteriormente descritos.

HBME-1

O HBME-1 (Hector Battifora Mesothelial Antigen) é um anticorpo monoclonal que reage com um epitopo desconhecido na superfície microvilositária das células mesoteliais. Na tireóide, o HBME-1 é relativamente selectivo para carcinomas, incluindo o carcinoma folicular e o CP. A positividade para este anticorpo em lesões malignas do epitélio folicular varia entre 50 e 100%, segundo os diferentes trabalhos publicados. Num estudo de Miettinen et al. todos os casos de CP (145) e todos os casos de carcinoma folicular (27) foram positivos para o HBME-1.[82] A positividade foi encontrada na maioria das células, em ambos os grupos. Os casos de VFCP não foram individualizados, mas foi referido que o seu padrão de marcação é idêntico ao dos CPC.

Em cerca de 33% dos casos de bócio nodular observou-se marcação focal; em 6% dos casos a marcação foi difusa. Na tireoidite linfocítica crónica, detectou-se marcação na maior parte dos casos; esta foi moderada em quase 33% dos casos. No grupo dos adenomas foliculares apenas 28% tiveram expressão de HBME-1; destes, cerca de metade tiveram expressão multifocal ou difusa. A tireóide normal foi negativa. Sack et al. verificaram que 5/7 CP, um carcinoma folicular e 1/4 tumores "híbridos" estudados foram difusamente positivos para HBME-1 (em citologia e histologia).[83] Cinco de 10 casos benignos foram focalmente positivos na histologia, por vezes em relação com áreas de tireoidite linfocítica. Num outro estudo em biopsia aspirativa, foi observada uma sensibilidade do HBME-1 no diagnóstico de CP de 100% (21/21 casos).[84] Neste trabalho não foi feita referência a VFCP. A intensidade de marcação foi variável, predominantemente difusa. A especificidade foi de 76%: 4/18 adenomas foliculares e 5/20 bócios também foram focalmente positivos para HBME-1. É importante referir que o HBME-1, à semelhança da citoqueratina 19, quase não é expresso na hiperplasia papilífera e é muito frequentemente observado nos CP. Por tal motivo, Cheung et al., sugeriram o seu uso conjunto no diagnóstico de CP.[68] Neste estudo, todos os adenomas foliculares e todas as hiperplasias nodulares foram negativas para o HBME-1. Cerca de metade (54%) dos carcinomas expressaram HBME-1. Dos 138 CP, 76 (55%) foram positivos. No sub-grupo das VFCP 38/84 casos (45%) expressaram o HBME-1. Este valor foi ligeiramente maior nos CPC 38 casos (70%) positivos. Dos 4 carcinomas foliculares, 2 expressaram HBME-1. Portanto este marcador foi específico no diagnóstico de malignidade, mas não totalmente sensível. Recentemente, Rigau et al. referiram positividade focal para HBME-1 em adenomas foliculares e bócios nodulares, contrariando sugestões anteriores de que este antigénio não seria expresso em lesões benignas da tireóide.[85]

Proteína S100

Num estudo de McLaren et al., foi estudada a expressão da proteína S100 e de EMA.[86] Observou-se imunorreactividade intensa em todos os carcinomas papilares (14) – incluindo as 5 VFCP – difusa na maioria dos casos. Nas hiperplasias papilíferas, a expressão da proteína S100 esteve quase sempre ausente; quando presente foi focal e fraca. Em três de cinco adenomas foliculares a proteína S100 foi positiva com intensidade variável – e apesar de a sua expressão ter sido mais fraca que nas VFCP, a sobreposição dos resultados não permitiu uma separação clara entre os dois tipos de tumor. No parênquima normal observou-se expressão fraca e focal deste antigénio.

EMA

No estudo acima referido, McLaren et al. estudaram também a expressão de EMA (Epithelial Membrane Antigen).[86] Nos CP, o EMA teve um padrão de expressão semelhante à proteína S-100, só que com uma maior variabilidade na intensidade de expressão. Nas hiperplasias papilíferas, a expressão de EMA foi fraca e multifocal. No parênquima restante, em todos estes casos, houve expressão deste antigénio; no entanto a sua variabilidade não permitiu a definição de um padrão "normal" de marcação. No estudo de Raphael et al. não houve diferenças na expressão de EMA entre CP e lesões benignas (adenomas e carcinomas foliculares e hiperplasias nodulares).[71] Em todos os grupos a marcação foi focal.

Bcl-2 e Bax

Manetto et al. estudaram a expressão de Bcl-2 e Bax – proteínas anti e pró-apoptótica, respectivamente - em tumores da tireóide.[87] Todos os tumores diferenciados (incluindo duas VFCP), apresentaram expressão de Bcl-2. A percentagem de células marcadas com este anticorpo nas VFCP foi de 80 e 90%, idêntica à dos CPC. Ao invés, os carcinomas anaplásicos foram negativos para este anticorpo. Na tireóide normal observou-se marcação universal para Bcl-2, com localização no citoplasma das células foliculares. Já a marcação com o anticorpo para o Bax foi quase inversa: positiva em quase todas as células dos carcinomas anaplásicos, decrescendo em número de células positivas e intensidade de marcação com a maior diferenciação dos tumores. Nas duas VFCP estudadas, observou-se positividade em escassas células, resultado idêntico ao obtido com os CPC. Na tireóide normal a marcação para Bax foi observada apenas em raras células foliculares e para-foliculares, e com um padrão finamente granular, na região apical das células. Bell et al. não observaram diferenças significativas entre nódulos benignos e VFCP, usando "marcadores de apoptose" (Bcl-2 e Caspase-3).[15]

CD57

O CD 57 (HNK-1) é um oligossacarídeo identificado, pela primeira vez, em linfócitos NK normais, e que está também presente em células neuroepiteliais durante a embriogénese. Foi também observada expressão de CD57 em tumores epiteliais de vários órgãos, em tumores neuroectodérmicos e das bainhas nervosas, em lesões epiteliais benignas, (hiperplasia prostática) e, raramente, em epitélios normais. O anticorpo (nomeadamente o clone leu-7, que é o mais utilizado) liga-se especificamente à glicoproteína associada à mielina nas células das bainhas nervosas, às células NK e a

glicoproteínas da superfície de outras células. O epitopo antigénico glicídico parece ser comum a todos estes tipos celulares.

Khan et al. estudaram a expressão de CD 57 em lesões da tireóide.[88] No grupo dos carcinomas (sendo a grande maioria, 71, CP), 95% foram positivos; 30 das 31 VFCP expressaram CD 57 (marcação forte em 26 e fraca em 4). É de referir que o padrão de positividade observado nos CPC e VFCP foi semelhante. No que respeita às lesões benignas, 27% dos adenomas foliculares e 10% dos nódulos colóides foram positivos, todos eles fracamente. Não foi observada expressão de CD 57 na tireóide normal. A presença de expressão de CD 57 foi, portanto, significativamente mais frequente em carcinomas (incluindo em VFCP), relativamente à tireóide normal e a lesões benignas.

Ciclinas, p27 e Ki67/Mib1

As ciclinas são proteínas essenciais para a progressão do ciclo celular. Ao formarem um complexo com as cínases dependentes das ciclinas (CDK), estas são activadas e fosforilam substratos (outras proteínas) permitindo a continuação do ciclo celular. A p27, pelo contrário, é inibidora das CDK, regulando negativamente o ciclo celular. Duma maneira geral, as neoplasias podem ter uma sobre-expressão das ciclinas (os reguladores positivos) ou uma sub expressão da p27 (ou de outros reguladores negativos). A p27 controla a transição das células de um estado de quiescência para um estado de proliferação. Juntamente com a p21 e a p57, ela inibe a actividade cinásica das ciclinas pré-activadas da fase G1: ciclinaE/CDK2, CiclinaD/CDK4-6 e outras. É importante referir que as células em repouso têm um nível alto de p27, que desce aquando da entrada no ciclo celular; sendo estes níveis controlados, em parte, por vias proteossoma-ubiquitina. O Ki-67/Mib1 é uma proteína não-histónica que é expressa apenas em células em proliferação, atingindo a sua expressão máxima nas fases G2 e M. Funciona, portanto, como um marcador de proliferação.

O estudo de Wang et al. tentou elucidar qual o estado de expressão imunohistoquímica da p27 e das ciclinas D1 e E em tumores da tireóide.[89] Não foram detectadas diferenças significativas na expressão das ciclinas D1 e E entre as VFCP e adenomas foliculares. Por outro lado, houve diferença significativa no grau de expressão da p27: foi significativamente mais alta nos adenomas foliculares do que nas VFCP. Não se observou imunorreactividade para as ciclinas D1 e E na tireóide normal de todos os casos de ambos os grupos. Observou-se, no entanto, positividade forte para p27 em mais de 50% das células tireoideias normais em todos os casos. Estes resultados são compatíveis com o estado quiescente da tireóide normal. Ao contrário do referido por Wang et al., Resnick et al. verificaram, num grupo de 87 tumores da tireóide, que a maracação para a p27 não conseguia distinguir a VFCP do adenoma folicular e, portanto, a sua detecção não teria grande importância no diagnóstico de tumores da tireóide.[90] Num estudo efectuado em biopsias aspirativas, Troncone et al. verificaram que a expressão de p27 em hiperplasia nodulares tinha valores significativamente mais

altos do que em CP ou "tumores foliculares", apesar de haver alguma sobreposição de valores.[91]

Tallini et al. estudaram a expressão imunohistoquímica da p27 e do Ki67/Mib1 em tumores da tireóide.[92] Estes foram divididos em três grupos, que teriam prognósticos diferentes, tendo em conta as características clínico-morfológicas. Foi observada uma correlação significativa entre esta divisão em três grupos e a expressão de p27 e Ki67, com uma tendência para uma expressão mais baixa de p27 e mais alta de Ki67 se verificarem nos grupos 2 e 3, os de pior prognóstico (os 17 casos de VFCP foram incluídos no grupo 1). Bell et al. constataram que o Ki67 teve valores significativamente mais elevados nas VFCP,[15] quando comparados com nódulos benignos. Dentro do "grande grupo" dos CP, Ivanova et al. não encontraram diferenças significativas de expressão do Mib1 entre três sub-grupos: clássico, VFCP e VFCP difusa.[18]

CD44

O CD44 é uma glicoproteína transmembranar que contém sulfato de heparano e que tem um papel importante na adesão célula-a-célula e célula-matriz. O seu gene localiza-se em 11p13, tem pelo menos 20 exões, 10 dos quais com "splicing" alternativo (V1-V10); a proteína sofre, também, alterações pós-tradução. A forma "standard" (s) é a que predomina nos tecidos normais (é o receptor do ácido hialurónico) e não tem nenhum produto de splicing alternativo; as variantes diferem entre si na região média da molécula, que tem localização extra-celular. Nos epitélios normais a expressão de CD44 é "específica de tecido": é fortemente positiva em epitélios pavimentosos e é menos positiva em epitélios colunares. O CD44 parece ter um papel importante na agregação, motilidade e comportamento metastático das células malignas. Na transformação maligna tanto pode haver perda como ganho da expressão desta molécula. Níveis mais elevados que o normal da variante 6 – CD44v6 – estão associados a comportamento agressivo em vários carcinomas, p. ex., do colo do útero e em linfomas não-Hodgkin. Por outro lado, níveis do mesmo CD44v6 mais baixos que o normal, estão associados a pior prognóstico em carcinomas epidermóides pouco diferenciados, carcinomas superficiais da bexiga e carcinomas da próstata. Em relação ao CD44v3: expressão reduzida estaria associada a progressão do carcinoma do colo uterino; expressão aumentada estaria associada a pior prognóstico no carcinoma colo-rectal. Segundo Böhm et al., o CD44s, o CD44v3 e o CD44v6 são expressos em tecido tireoideu normal e neoplásico.[93] Böhm et al. estudaram a expressão destas três formas de CD44 em doentes com carcinomas bem diferenciados da tireóide. Observaram positividade forte para CD44s e v6, e menos intensa para a isoforma v3. Os CP (não foram individualizadas as VFCP) tiveram mais frequentemente expressão alta de CD44s e v6 do que os carcinomas foliculares. Portanto, os CP mantiveram níveis de expressão de CD44s e v6 semelhantes aos da tireóide normal, enquanto que nos carcinomas foliculares a sua expressão foi mais baixa. O CD44v3 foi expresso equilibradamente entre os dois grupos de tumores, mas num nível muito mais baixo do que as outras duas

formas. A perda de expressão de CD44s correlacionou-se significativamente com idade acima dos 60 anos, metástases à distância, pTNM avançado, recidiva tumoral e mortalidade relacionada com o tumor.

Bartolazzi et al. também estudaram a expressão de CD44v6, para além da galectina-3 (referida acima).[77] O CD44v6 foi menos sensível e menos específico na detecção de malignidade do que a galectina-3. Os resultados obtidos com este marcador foram idênticos aos referidos por outros autores.

Caderinas/Cateninas

A α-catenina pertence a um conjunto de moléculas fundamentais na adesão entre as células epiteliais: o complexo caderina-cateninas. A função da α-catenina é a ligação da rede actínica do citoesqueleto às outras duas cateninas, que são a β e a γ. Estas, por sua vez, ligam-se directamente ao domínio citoplasmático da E-caderina, proteína que estabelece a ligação com as células vizinhas através do seu domínio extra-celular. Uma alteração na função de qualquer uma destas proteínas poderá, portanto, prejudicar a função do complexo e, consequentemente, da adesão celular. Para além da manutenção das junções intercelulares, a E-caderina é, também, importante na diferenciação e polarização das células epiteliais. A diminuição da expressão membranar da E-caderina e das cateninas e/ou o aumento da sua expressão citoplasmática foram observados em alguns tumores e correlacionados com comportamento tumoral mais agressivo. Baloch et al. estudaram a expressão imunohistoquímica de α-catenina em lesões da tireóide.[94] Nos adenomas foliculares e em tireóide adjacente às várias lesões, observaram reactividade membranar focal, moderada a forte, na ausência de reactividade citoplasmática. Os carcinomas foliculares apresentam igualmente expressão membranar forte, para além possuírem também expressão citoplasmática. Estes autores observaram, ainda, expressão citoplasmática de α-catenina em 5 de 8 VFCP, num dos casos em simultâneo com expressão membranar. Em relação aos CPC, foi observada expressão citoplasmática em 14 de 18 casos. A expressão membranar da α-catenina nos CP passou, assim, a ser mais fraca e a ser observada no citoplasma. A expressão citoplasmática da α-catenina foi mais frequente nas lesões malignas e mais frequente nos CPC do que nas VFCP.

Sialyl Lewis X, Lewis X e Sialyl Lewis A

Os antigénios do grupo sanguíneo Lewis são hidratos de carbono complexos expressos na superfície celular. Foram descritas alterações no seu padrão de expressão em vários órgãos, em associação com lesões pré-malignas e malignas, entre os quais a tireóide.[95] Pensa-se que, durante a evolução do processo neoplásico, alguns destes antigénios

(sialyl Lewis x e silalyl Lewis a) poderão estar associados a invasividade e metastização, por meio de adesão ao endotélio vascular e à matriz extracelular.[96] Além disso, estes antigénios poderão também modular a resposta imunológica do hospedeiro. O sialyl Lewis x (sLex) e o Lewis x (Lex) são antigénios Lewis tipo 2; o sialyl Lewis a (sLea) é um antigénio Lewis tipo 1. Os diferentes tipos correspondem a diferentes estruturas glicídicas na composição de cada antigénio.

No trabalho efectuado pelo nosso grupo (Fonseca et al.) observou-se expressão forte e difusa de sLex antigénio nos 27 CP (dos quais 5 VFCP) estudados.[95] Onze de 12 carcinomas foliculares também mostraram expressão. As lesões benignas (adenomas foliculares e bócios/hiperplasias papilíferas) foram bastante menos frequentemente positivas (15-20%) e a tireóide normal foi negativa. Os resultados obtidos por Bryne et al. foram idênticos aos atrás referidos no que respeita aos CP e lesões benignas, mas não em relação aos carcinomas foliculares, que para estes autores foram negativos.[97] Em relação ao Lex que corresponde ao CD15 e ao LeuM1 utlilizados em alguns trabalhos, Fonseca et al. obtiveram resultados semelhantes aos obtidos com o sLex.[95,98] Com o sLea (CA19-9 nalguns artigos) os resultados foram um pouco diferentes, já que este antigénio não foi detectado em tireóide normal nem nas lesões benignas, e foi detectado apenas em 67% dos CP. Fonseca et al. verificaram também que em 14 nódulos tireoideus com aspecto histológico adenomatoso, mas com áreas de VFCP, o sLex foi quase sempre positivo apenas nestas áreas, tendo sido negativo nas áreas adenomatosas.

Ivanova et al. estudaram a expressão de sLex, Lex (e Mib1) em três grupos de CP: CPC, VFCP difusa e VFCP.[18] O sLex foi significativamente mais expresso nas VF difusas do que nas VFCP. Não se observou diferença significativa de expressão do sLex relativamente aos CPC. O Lex foi significativamente menos expresso nas VFCP e nas VF difusas do que nos CPC. Considerando a totalidade dos carcinomas, Ivanova et al. verificaram uma associação significativa entre a expressão de sLex e multicentricidade/disseminação intra-tireoideia e invasão extra-tireoideia, o que apoia dados anteriores sobre um papel deste antigénio na capacidade invasiva das células tumorais.[18]

O CD15 e o CA19-9 foram identificados em vários tipos de tumores, entre os quais o CP. Num dos trabalhos atrás referidos, em que também foi estudada a expressão de HBME-1, Van Hoeven et al., observaram menor sensibilidade do CD15 e do CA19-9 relativamente ao HBME-1, no diagnóstico de CP, já que apenas marcaram 15/21 (71%) e 13/21 (62%), respectivamente, enquanto que a expressão de HBME-1 foi detectada em 21/21 casos (100%).[84] No entanto, estes anticorpos tiveram especificidades de 95 e 97%, respectivamente, no diagnóstico de CP. Apenas 2 nódulos benignos (1 adenoma folicular e 1 bócio) foram positivos para CD15. Com o CA 19-9 apenas um caso de bócio foi positivo. No estudo de Miettinen et al. (referido acima), em que foi igualmente estudada a expressão de HBME-1, todos os casos de CP (excepto um) também foram positivos para CD15 (Leu-M1), mas a quantidade de células positivas foi menor.[82] Cerca de 2/3 dos carcinomas foliculares foram positivos para CD15, com intensidade variável. Dos casos benignos, 17% dos bócios nodulares e 13% dos adenomas foliculares tiveram marcação variável para o CD15.

Ret

A importância do Ret em diagnóstico resulta da sua aparente especificidade para CP (ver descrição no próximo capítulo). No entanto deve referir-se que o valor da detecção do Ret por imunohistoquímica não é fiável, uma vez que alguns tumores com rearranjos demonstrados não mostram expressão imunohistoquímica. Também a marcação não específica ou artefactual e a inconsistência entre os resultados imunohistoquímicos e de imunoblot são apontados como prova desta falta de fiabilidade. Como explicações para esta discrepância são referidas a qualidade muito variável, por vezes fraca, dos anticorpos disponíveis, o pior reconhecimento da proteína quimérica por anticorpos "pan-Ret", os níveis variáveis de expressão da proteína e a expressão do Ret "wild-type". Cerilli et al. usaram anticorpos monoclonais para o Ret em vários grupos de lesões da tireóide.[69] A maior parte dos CP mostrou positividade para o Ret (20/30, incluindo 7/12 VFCP). Dois adenomas foliculares tiveram marcação fraca e focal, e todos os adenomas e carcinomas de células de Hürthle tiveram marcação forte e difusa com o anticorpo Ret. A positividade foi variável nos CP (incluindo VFCP), tendo vários casos sido negativos. Todos os carcinomas foliculares foram negativos. A positividade para o Ret, nas lesões de células de Hürthle (não papilares), foi comprovada usando RT-PCR para detectar o ARNm do domínio tirosina-cínase do Ret em 6 lesões de células de Hürthle (3 adenomas e 3 carcinomas) – todos foram positivos. Note-se que, devido à estratégia utilizada, não se sabe se houve rearranjo, ou se houve indução da expressão do Ret "wild-type" ou se existiu qualquer outro problema. A detecção do Ret por imunohistoquímica é menos sensível e específica do que a da citoqueratina 19 no diagnóstico de CP.

Num estudo de Cheung et al. foram estudados 138 CP, o Ret foi positivo por imunohistoquímica em 78% (42/54) dos CPC e em 63% (53/84) das VFCP estudadas.[68] No entanto não foi totalmente específico para CP, dado que também foi positivo em alguns casos de carcinoma de células de Hürthle e insular.

Met

O Met é um receptor de membrana com actividade tirosina-cínase, cujo ligando é o HGF (Hepatocyte Growth Factor). Na tireóide, esta proteína é expressa predominantemente em CP, incluindo VFCP. Num estudo em que foi observada expressão do Met em material de citologia, 8/11 casos de VFCP (72,7%) foram positivos.[99] Neste estudo também se observou positividade em 12/14 CPC, 7/25 carcinomas foliculares e em 5/5 adenomas "atípicos"; nenhuma outra lesão benigna foi positiva. No entanto, as lesões benignas (adenomas foliculares e nódulos de bócio) podem expressar a proteína Met, ainda que mais fracamente.

Retinoblastoma

Num estudo sobre a presença da proteína do Retinoblastoma, Anwar et al. observaram positividade em mais de 10% das células em todos os adenomas foliculares e em 89% das hiperplasias nodulares.[100] Todos os CP e quase todos os carcinomas foliculares foram negativos. A maior parte dos tumores de Hürthle foram negativos. Todos os carcinomas anaplásicos foram positivos.

PAX8-PPARγ1

No estudo de Kroll et al. sobre a translocação PAX8-PPARγ1, 7 de 8 carcinomas foliculares tiveram expressão forte e difusa do anticorpo para o PPARγ1. Essa expressão foi, apenas, focal nos restantes casos: 20 adenomas foliculares, 10 CP e 10 hiperplasias nodulares.[101]

Estudos combinados

Numa tentativa de aumentar a sensibilidade e a especificidade no diagnóstico dos carcinomas da tireóide, foi estudado o uso combinado de vários anticorpos. Mai et al. observaram uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 90% no diagnóstico de CP com uma combinação do HBME-1 com citoqueratinas de alto peso molecular ou com o CD57 ou com o CD15.[102] A positividade foi definida como a presença de mais de 10% das células com marcação. Os autores referiram a presença de características mais ténues de CP nos tumores positivos para o HBME-1, sugerindo a hipótese de estes tumores ocuparem uma posição intermédia entre as lesões benignas e os CP. Num estudo de Cheung et al.,[68] todos os adenomas foliculares e todas as hiperplasias nodulares foram negativas para o HBME-1 e para o Ret; alguns destes tumores expressaram citoqueratina 19, mas os autores consideraram este padrão de expressão relacionado com a biopsia aspirativa. O HBME-1 foi positivo em 54% dos carcinomas de origem folicular: 76/138 CP, 2/4 carcinomas foliculares, 1/2 carcinomas anaplásicos. Dentro do grupo das VFCP, 45% expressaram HBME-1, 57% expressaram citoqueratina 19 e 63% expressaram o Ret. Apenas 8% das VFCP (7 casos) e 6,5% de todos os CP (9 casos) foram negativos para os três marcadores. Como 3/6 carcinomas insulares foram positivos para a citoqueratina 19 e para o Ret os autores sugeriram a sua origem a partir de CP. De igual modo, como 29% dos carcinomas de células de Hürthle foram positivos para a citoqueratina 19 e 57% para o Ret, os autores sugeriram serem estes tumores variantes de células de Hürthle de CP. Finalmente, os carcinomas foliculares e os carcinomas anaplásicos foram negativos para o Ret e a citoqueratina 19. Em conclusão, a expressão dos 3 marcadores foi considerada muito específica de CP, a

positividade apenas para o HBME-1 foi considerada indicadora de malignidade e a expressão do Ret e/ou de citoqueratina 19 (difusa) favoreceu o diagnóstico de CP.

BIOLOGIA MOLECULAR

As alterações genéticas mais frequentes no CP são as associadas aos genes *RET*, *BRAF* e *NTRK*. Ao adenoma e ao carcinoma folicular estão associadas as mutações do gene *RAS* e a presença da translocação PAX8-PPARγ1. Ao carcinoma anaplásico estão associadas mutações do gene *P53*. As mutações no *TSH-r* e na proteína G surgem em nódulos "quentes" benignos (adenomas) e, menos frequentemente, em carcinomas foliculares; são muito raras em CP.

RET

O gene *RET* localiza-se no cromossoma 10q11.2 e codifica um receptor dos factores de crescimento da família GDNF: o próprio GDNF, a neurturina, a artemina, a enovina e a persefina. Este receptor, que possui actividade tirosina-cínase, realiza a transdução intra-celular de sinais externos em conjunto com os receptores de membrana dos ligandos da família do GDNF (GFRα).[103] Além do domínio tirosina-cínase citoplasmático, o *RET* possui um domínio extra-celular com uma região justa-membranar rica em cisteína e um domínio que apresenta homologia com as caderinas. Este gene é importante no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso entérico e do rim, sendo expresso nestes órgãos e em células neuronais e dos tecidos neuro-endócrinos. As mutações pontuais germinativas do gene *RET* dão origem uma activação constitutiva do gene *RET* e estão presentes em síndromes tumorais familiares: MEN2A, MEN2B e carcinoma medular familiar da tireóide (CMFT). As mutações pontuais somáticas deste gene ocorrem em carcinomas medulares esporádicos e feocromocitomas. Ocorrem, também, mutações pontuais inactivantes, associadas à doença de Hirschprung. Há, finalmente, alterações resultantes de rearranjos (inversões e translocações), que aparecem em CP da tireóide. O gene *RET* activado, rearranjado, foi isolado pela primeira vez em células de uma linha celular da tireóide – NIH-3T3 – que tinham sido transfectadas com ADN de um linfoma T. Os rearranjos do gene *RET* consistem na fusão do domínio tirosina-cínase (TK) intracelular deste gene com diferentes fragmentos 5` (de outros genes), passando a haver expressão constitutiva, inapropriada, do domínio TK truncado – esta expressão acontece em todos os rearranjos do gene *RET*. Todas as alterações são equilibradas e quase todas envolvem o intrão 11 do *RET*, situado entre os domínios transmembranar e TK do gene *RET*. Portanto, o fragmento truncado deste gene perde o domínio transmembranar e localiza-se no citosol. É importante referir que os "parceiros" de fusão do gene *RET* são expressos ubiquitariamente – inclusive nas células foliculares da tireóide, sendo essa a razão que leva à expressão do gene *RET* quando rearranjado com esses genes. Os genes "parceiros" codificam proteínas com motivos de dimerização e estimulam, assim, a actividade cinásica do *RET*. Esta activação determina a estimulação crónica da transdução de sinais, independentemente da presença do ligando, favorecendo a possibilidade de surgir uma neoplasia. A expressão do domínio tirosina-cínase do *RET*

normalmente não é detectável no epitélio folicular da tireóide. É, contudo, expresso nas células C, que constituem cerca de 1% da população celular da tireóide normal.

A prevalência dos rearranjos do gene *RET* no CP da tireóide varia de acordo com a idade do doente, com a sua exposição prévia a radiação, com a área geográfica de proveniência do doente, com o tipo de CP em estudo e, finalmente, com os métodos usados para a sua detecção. O rearranjo RET/PTC1 está presente em cerca de 40% e o RET/PTC3 em cerca de 15% dos CP esporádicos, não associados a radiação.[103] Seguem-se, por ordem de frequência, o RET/PTC2 e o 4. Os rearranjos RET/PTC 1, 2 e 3 e o rearranjo ELKS/RET foram identificados, primeiro, em CP não associados a radiação mas, posteriormente, foram também detectados nos CP associados a radiação. A maior parte dos restantes rearranjos foi identificada, apenas, em tumores associados a radiação.[1,103] Nos CP associados a radiação a prevalência de rearranjos do *RET* é mais elevada do que nos esporádicos, podendo chegar a perto de 80% dos casos.[1,103]

As características histológicas e moleculares dos CP esporádicos, na população geral, são um pouco diferentes das características dos CP associados a (ou induzidos por) radiação. Nos últimos anos houve grandes avanços nesta área devido ao acidente com um reactor nuclear na central de Chernobyl. As populações que, na altura do acidente, viviam nas regiões mais atingidas pela radiação têm sido seguidas muito atentamente, do ponto de vista médico. É sabido que que os CP não relacionados com exposição a radiação são raros em crianças. No entanto, após o acidente na central nuclear de Chernobyl, na região atingida pela radiação houve um aumento de até cem vezes na incidência anual de carcinoma da tireóide em idade pediátrica, fundamentalmente de CP – a incidência de carcinoma da tireóide neste período da vida é cerca de 0,3-1,3 casos por milhão de pessoas por ano.[104,105] Não foi estabelecida qualquer relação entre carcinoma folicular e radiação.[106] O aumento do CP verificou-se na Bielorrússia, Ucrânia e Oeste da Rússia, surgiu num período de tempo curto e foi mais notório a partir de 1992. A relação entre CP e radiação não é novidade, sendo desde há muito sabido que ele é o tumor sólido mais frequentemente associado a radiação. De facto, quer num contexto de radiação terapêutica, quer em exposição após a explosão de armas nucleares – Japão na 2ª Guerra Mundial, testes nucleares nas Ilhas Marshall – houve um aumento na incidência deste tumor. É interessante referir que se conseguiu induzir, "in vitro", o rearranjo ret/PTC1 através de irradiação com doses elevadas de raios-X .[107]

Nos CP pediátricos "pós-Chernobyl" há um predomínio de variantes sólidas e VFCP, "em detrimento" dos CPC, respectivamente 37, 29 e 18-26%.[104,105] Pelo contrário, nos CP pediátricos esporádicos, as frequências relativas dos diferentes subtipos são semelhantes às de adultos, respectivamente 4, 17 e 70%.[104]

Parece haver uma maior prevalência de rearranjos do *RET* nos dois grupos de CP pediátricos (44 a 77% nos "pós-Chernobyl" e 65% nos esporádicos), em relação ao grupo de adultos com CP (varia entre 2,5 e 40%, consoante a área geográfica).[104,105,106] Nos CP pediátricos "pós-Chernobyl" há um predomínio do rearranjo RET/PTC3 (RET/PTC3 vs RET/PTC1: 34-58% vs 16-20%).[104,105] No grupo dos CP esporádicos a distribuição dos diferentes rearranjos é semelhante à dos CP esporádicos em adultos

(RET/PTC3 vs RET/PTC1: 18% vs 47%).[104] Portanto, a idade parece ser um factor importante na frequência global, mas não na proporção relativa de rearranjos do gene *RET*: em doentes com menos de trinta anos de idade e sem história de exposição a radiações a sua frequência é mais alta do que em doentes mais velhos.

Considerando as diferentes variantes morfológicas de CP (neste caso juntando tumores esporádicos com tumores associados a radiação) verifica-se um predomínio claro do rearranjo RET/PTC3, nas variantes sólidas (79%); apenas 7% destas têm o rearranjo RET/PTC1 (estatisticamente significativo). Nas VFCP, 45% têm o rearranjo RET/PTC3 e 18% o RET/PTC1 (sem significado estatístico).[104,105] Nos CPC, 38 a 41% possuem o rearranjo RET/PTC1, 18 a 19% têm o RET/PTC3 e 5% têm o RET/PTC2 (estatisticamente significativo).

A associação entre as diferentes variantes morfológicas e os diferentes tipos de rearranjos do gene *RET* é interessante. Há uma associação muito forte do rearranjo RET/PTC3 à variante sólida (sólido-folicular,[105,106] para alguns autores) e uma associação menos forte do rearranjo RET/PTC1 à forma clássica.[104,105,106]

No que respeita à relação entre sexo feminino e masculino, os resultados são discrepantes. Com efeito, no trabalho de Nikiforov et al. a proporção entre sexos foi significativamente diferente: no grupo dos CP associados a radiação a relação feminino/masculino foi equilibrada – 0,9:1 – enquanto que no grupo dos esporádicos foi de 6,6:1.[104] Thomas et al. encontraram um valor de 2,7:1 no grupo dos CP associados a radiação, um valor mais próximo do habitual nos CP em geral.[105]

Nos casos de CP no contexto de Chernobyl, o rearranjo RET/PTC1 está associado com um período de latência maior e com doentes mais velhos. O rearranjo RET/PTC3 está associado a um período de latência menor, níveis mais altos de radioactividade e a tumores mais agressivos, com extensão extra-tireoideia e tamanho maior.

Também em alguns CP esporádicos parece haver uma correlação entre o comportamento do tumor e o tipo de rearranjo presente. Basolo et al. observaram a presença do rearranjo RET/PTC3 em CP de células altas: em 39 casos de variante de células altas estudados, os 14 casos com rearranjo do *RET* (35,8%) tiveram todos o mesmo rearranjo: RET/PTC3.[108] Esta variante de CP é mais agressiva e tem pior prognóstico que o CPC e a VFCP: tem mais frequentemente extensão extra-tireoideia e metástases à distância, tem também maior mortalidade, cerca de 20-30%. Basolo et al. sugeriram que o rearranjo RET/PTC3 poderia estar associado à maior agressividade das variantes de células altas. De facto, numa linha celular, o rearranjo RET/PTC3 teve um efeito mitogénico mais potente e uma maior activação da via das MAPK, do que o RET/PTC1.[108] Portanto, poderá existir uma correlação entre rearranjos específicos do gene *RET* e a agressividade dos CP, que poderá depender da eficiência com que cada tipo de rearranjo transmite os sinais mitogénicos às células. No entanto, no mesmo estudo estes autores descreveram rearranjos do gene *RET* em 3 de 12 casos de VFCP (25%), tendo num deles sido o RET/PTC1 e nos outros dois o RET/PTC3. Estes números foram semelhantes aos dos 39 casos de CPC da mesma série: 11 destes

(27,5%) tiveram rearranjos do *RET* – 5 com RET/PTC1 e 6 com RET/PTC3. Não são fornecidos dados sobre se estes casos de VFCP e CPC com rearranjo RET/PTC3 são mais agressivos. Num trabalho recente, Zhu et al.encontraram apenas 1/30 casos de VFCP com rearranjo RET/PTC (o RET/PTC3).[44] Em contrapartida, nos restantes 46 CP (incluindo 43 CPC) foram observados 13 (28%) com rearranjo (9 RET/PTC1 e 4 RET/PTC3).

O papel do rearranjo do gene *RET* na carcinogénese papilar na tireóide é apoiado pelos resultados de experiências de transformação de células tireoideias em cultura pelo gene de fusão RET/PTC e pelo aparecimento de CP da tireóide em ratos transgénicos com os rearranjos RET/PTC1 e RET/PTC3.[103] Foi demonstrado que os diferentes rearranjos do *RET* – nomeadamente o RET/PTC1 e o RET/PTC3 – estão associados a diferentes fenótipos: em glândulas tireóides de ratos foi induzida a expressão dos dois tipos de rearranjos e os tumores resultantes tiveram fenótipos diferentes: papilar com o RET/PTC1, sólido com o RET/PTC3 (idêntico ao ser humano). A razão desta diferença não é conhecida; o fragmento de *RET* presente é idêntico nos dois rearranjos e não parece haver diferenças na activação da função tirosina-cínase. A explicação poderá residir nas funções diferentes dos diferentes genes "parceiros".

Portanto, em CP relacionados, ou não, com radiação há uma associação preferencial de determinados rearranjos com determinados padrões morfológicos e características clínico-patológicas. Alguns rearranjos têm alta frequência em carcinomas pequenos, clinicamente silenciosos (principalmente o rearranjo RET/PTC1),[109] outros estão presentes preferencialmente em tumores mais agressivos, nomeadamente o RET/PTC3 em variantes sólidas (até 79%) e de células altas.[1,108]

Curiosamente a frequência dos rearranjos RET/PTC é maior nos micro-carcinomas do que nos carcinomas clinicamente evidentes. Os rearranjos podem ser um acontecimento precoce na carcinogénese do CP e não parecem ser importantes na sua progressão: a sua frequência é baixa em carcinomas pouco diferenciados, cerca de 20%:[1] estes tumores têm, regra geral, um componente bem diferenciado. Até 95% dos doentes com tireoidite de Hashimoto, sem sinais de CP no exame histológico, podem ter expressão elevada de RET/PTC1 e 3.[110] Este é mais um dado a favor da precocidade destes rearranjos na carcinogénese papilar. Fusco et al. demonstraram a presença de activação do *RET* em nódulos da tireóide com características morfológicas incompletas de CP: a sua presença foi vista, apenas, em células com características nucleares de CP.[111] Os autores sugerem que estes focos poderão preceder o aparecimento de CP "invasor".

NTRK1

O gene *NTRK1* (ou *TRKA*) também codifica um receptor transmembranar com actividade tirosina-cínase, localiza-se no cromossoma 1q22 e o seu ligando é o NGF. A sua expressão está limitada ao sistema nervoso periférico. Na tireóide o *NTRK1* é

activado por rearranjos (inversões e translocações) em que se dá a fusão do seu domínio tirosina-cínase com a região terminal 5′ de genes heterólogos: um processo idêntico ao que sucede com o *RET*. A proteína quimérica também possui actividade tirosina-cínase constitutiva, os mecanismos moleculares responsáveis pela activação do *NTRK1* são idênticos aos do *RET*.

Tal como no *RET*, os rearranjos do *NTRK1* parecem ser específicos do CP, mas com uma menor prevalência do que os rearranjos do *RET* – cerca de 10% dos casos (0-11%).[112] No entanto, os rearranjos do gene *NTRK1* são raros nos CP "pós-Chernobyl".[103]

MET

O gene *MET* codifica um receptor de membrana de 190 kDa com actividade tirosina-cínase, constituído por duas sub-unidades, sendo o seu ligando o HGF/SF. O HGF/SF tem um efeito mitogénico importante nas células epiteliais, incluindo na tireóide. A sobre-expressão do gene *MET* está associada sobretudo a CP.[113] O seu papel na estimulação parácrina do crescimento tumoral é evidenciado pelo facto de as células estromais da tireóide produzirem HGF. A relação da sua sobre-expressão com as características dos tumores não está bem explicada. Em alguns estudos, parece estar relacionada com estadio avançado e com sub-tipos tumorais de pior prognóstico. Noutros, contudo, verificou-se menor expressão do *MET* nos tumores menos diferenciados e uma correlação inversa com a presença de invasão vascular e de metástases à distância.

RAS

As mutações do oncogene *RAS* são, de entre todos os oncogenes, as mais frequentes em cancro no ser humano.[103] Os 3 genes *RAS* - H-*RAS*, K-*RAS* e N-*RAS* - sintetizam proteínas da mesma família, com 21 k-Da de peso. Estas proteínas encontram-se ligadas à face interna da membrana citoplasmática e possuem actividade GTP-ase. Na forma inactiva, a proteína Ras está ligada ao GDP, enquanto que na forma activa tem afinidade para e pode hidrolizar o GTP. A proteína Ras transmite sinais provenientes dos receptores membranares com actividade tirosina-cínase a uma cascata de fosfo-cínases activadas por mitogénios (as MAPK), que activam a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular. A activação oncogénica do gene *RAS* resulta de mutações pontuais que afectam o domínio de ligação ao GTP, situado no exão 1 - codões 12 ou 13 – ou o seu domínio GTP-ásico, situado no exão 2 – codão 61. A proteína fica, assim, "bloqueada" na forma activa. Nos carcinomas da tireóide estão descritas mutações nos 3 genes *RAS*. O papel do *RAS* na progressão tumoral não é muito claro: poderá ser um

acontecimento precoce, já que aparece tanto em adenomas como em carcinomas foliculares. Por outro lado, algumas mutações específicas, p. ex. no codão 61 do N-*RAS*, parecem estar associadas a progressão tumoral e comportamento clínico agressivo. Quer a frequência, quer o tipo de mutação são muito variáveis de estudo para estudo. Nos carcinomas foliculares foram descritas frequências de mutação até 80%, e nos carcinomas indiferenciados até 60%. As mutações do *RAS* também estão presentes em adenomas foliculares (24-53%).[44] Estas mutações parecem ser mais comuns em áreas com deficiência em iodo.[103] Os dados relativos à frequência de mutações do *RAS* em CP são díspares. As mutações do *RAS* poderão estar presentes em até 62% dos CP esporádicos. Não se identificaram mutações do gene *RAS* nos tumores associados com radiação (Santoro).[106] Os resultados obtidos recentemente por Zhu et al. contribuíram para aumentar a controvérsia sobre mutações do *RAS* e CP.[44] Com efeito, estes autores mostraram que as mutações deste gene não só são bastante frequentes, como são a principal alteração génica em VFCP. De facto, 13/30 (43%) casos de VFCP apresentaram mutações pontuais do *RAS* (69% das quais no codão 61 do N-*RAS*), enquanto que em nenhum dos restantes 46 CP (incluindo 43 CPC) foi encontrada qualquer mutação.

BRAF

Recentemente foram descritas alterações de um gene que codifica uma proteína da via MAPK (acima mencionada), o BRAF. Estas são mutações pontuais e localizam-se, principalmente, no segmento de activação do domínio cinásico, aumentando a sua actividade cinásica basal e tendo como consequência a activação de outra cínase a jusante, a ERK. As mutações deste gene foram observadas, em primeiro lugar, em nevos e melanomas e, também, em alguns carcinomas. Em 2003, Soares et al. detectaram uma mutação do BRAF em CP da tireóide, localizada no codão 599 (esta mutação perfaz 80% do total das mutações do BRAF).[114] De facto, Soares et al. observaram esta mutação em 23/50 (46%) CP e em 3/4 linhas celulares de CP. A mutação não foi observada em carcinomas foliculares nem em bócios nodulares. Em 1/51 adenomas foliculares observou-se uma mutação diferente do BRAF, localizada no codão 600. Soares et al. verificaram, ainda, que os CP com mutação do BRAF não tinham rearranjo RET/PTC (nem mutações do *RAS*) e vice-versa. Estes autores sugeriram, pois, que estes dois eventos seriam alternativos na oncogénese do CP, que passaria pela via MAPK, em ambos os casos. Além disso, sobressai a alta frequência de mutações do BRAF no CP. Num estudo acabado de publicar, do mesmo grupo, Trovisco et al. voltaram a observar uma frequência elevada de mutações do BRAF em CP: 45/124 (36%).[115] No entanto a prevalência foi muito diferente, consoante o subtipo de CP. Assim, 18/53 CPC (53%) tiveram a mutação, enquanto que nenhuma das 32 VFCP a teve (3 VFCP tiveram mutação do BRAF no codão 600). Há, portanto, uma associação entre mutação no codão 599 e arquitectura papilar, 6/8 CP de tipo tumor de Warthin também tiveram esta mutação. Até à data, as mutações do BRAF parecem ser exclusivas dos CP da tireóide.

β-catenina

A β-catenina é uma proteína com funções quer na adesão celular quer na transdução de sinais, regulando o desenvolvimento e a diferenciação celular durante a embriogénese. Normalmente a β-catenina localiza-se em complexos juncionais, na membrana celular e o seu nível citoplasmático é baixo, devido à sua degradação rápida pelo complexo ubiquitina-proteosoma. Se houver mutações activantes do gene da β-catenina esta não é degradada e dirige-se ao núcleo, ligando-se a factores de transcrição e estimulando a transcrição de genes alvo: c-myc, ciclina D1, c-Jun e Fra-1. Os factores de transcrição c-myc e c-Jun activam vários genes que estão envolvidos no crescimento e diferenciação celular. Na tireóide, alguns autores detectaram mutações activantes e/ou localização nuclear anormal da β-catenina em carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados, mas não em CP.[116]

Receptor da TSH

O receptor da TSH desempenha um papel central na fisiologia da célula tireoideia, nomeadamente o do metabolismo das hormonas tireoideias. Além disso, a sua estimulação parece também levar a proliferação celular, sendo, no entanto esta resposta limitada em tireóide normal. As células foliculares da tireóide dividem-se cerca de 5 vezes ao longo da vida do indivíduo. A resposta celular à TSH é mediada pelo AMPc e pela proteína G. Em adenomas e nódulos hiperplásicos pode haver uma activação da via do AMPc independentemente da estimulação pela TSH. Isto deve-se à ocorrência de mutações somáticas dos genes do receptor da TSH ou da subunidade α da proteína G. Como resultado, há uma activação constitutiva de uma destas proteínas e consequente aumento dos níveis de AMPc intra-celular e síntese hormonal contínua. Por esta razão estes nódulos são, normalmente, "quentes" e, frequentemente provocam hipertireoidismo. A frequência destas mutações nestas lesões é variável, consoante os estudos. Como valores "médios" pode-se considerar que cerca de 50% dos adenomas tóxicos têm mutações do receptor da TSH e cerca de 5% têm mutações da subunidade α da proteína G.[103] Também estão descritas mutações do receptor da TSH em carcinomas foliculares e pouco diferenciados, mas apenas em raríssimos casos.

PAX-8/PPARγ1

Em carcinomas foliculares e em alguns adenomas foliculares foi descrita a translocação PAX-8/PPARγ1.[101] Esta alteração estrutural resulta da fusão do gene *PAX-8*, localizado em 2q13 com o gene *PPARγ1*, localizado em 3p25. O PAX-8 é um factor de transcrição essencial na génese do epitélio folicular da tireóide e na regulação da expressão de

genes específicos da tireóide. O PPARγ1 é um receptor hormonal nuclear cujos ligandos inibem o crescimento e promovem a diferenciação de linhas celulares malignas. O PPARγ1 possui um domínio de ligação ao ADN e um domínio no terminal carboxílico que é responsável pela dimerização, pela ligação aos ligandos e pela activação transcricional.[101] Em consequência da translocação dá-se uma fusão do exão 7, 8 ou 9 do *PAX-8* com o exão 1 do *PPARγ1*. A proteína de fusão possui o domínio de ligação ao ADN do PAX-8 com todos os domínios do receptor nuclear PPARγ1. Em 2003, Zhu et al. vieram reforçar a "exclusividade" desta translocação nos adenomas e carcinomas foliculares: não a encontraram em 30 VFCP nem em 46 outros CP.[44]

Inibidores das CDK

Como discutido anteriormente a progressão no ciclo celular é comandada pelas ciclinas, ligadas às CDK e é frenada pelos inibidores das CDK: p21, p27, p15 e p16. A p21 funciona com efectora da p53 na paragem do ciclo celular em G1. Os tumores com mutações da p53 têm uma redução na quantidade de p21. Na tireóide normal e hiperplásica, a p21 não é expressa significativamente, mas os carcinomas podem expressar a p21. Por outro lado, estão descritas delecções raras do gene da p21 em CP, mas não em adenomas ou carcinomas foliculares. Nos tumores em que há mutações do gene da p21 não há alterações no gene da p53 nem no gene do Retinoblastoma. A diminuição da expressão da p27, observada em 10-20% dos CP, correlaciona-se com perda de diferenciação e fenótipos tumorais agressivos.[92] A p15 e a p16 raramente estão mutadas em tumores da tireóide.

Retinoblastoma

O gene do Retinoblastoma (Rb) codifica uma fosfo-proteína nuclear; o seu papel é ligar-se ao factor de transcrição E2F, impedindo-o de promover a progressão do ciclo celular. Por acção do complexo CDK/ciclina, a proteína Rb passa ao estado hiper-fosforilado e liberta o E2F, permitindo a passagem da célula pela transição G1/S e, consequentemente, a proliferação. Na tireóide não se encontraram alterações deste gene em nenhum tipo de lesão.

P53

O gene *P53* codifica uma fosfo-proteína nuclear que actua como factor de transcrição e regula o ciclo celular. A paragem do ciclo celular causada pela p53 pode suceder em G1

ou G2 e permite a reparação de danos provocados no ADN. Se as alterações forem suficientemente graves a p53 promove a apoptose. As mutações do gene da p53 são as mais frequentes em cancro humano e normalmente acontecem tardiamente. A sua presença permite uma acumulação excessiva de alterações do ADN que não são reparadas. A maior parte das mutações situam-se no domínio de ligação ao ADN, nos exões 5 a 8. Na tireóide elas estão presentes apenas nos carcinomas pouco diferenciados e, principalmente, em indiferenciados.[103]

PTEN

O gene *PTEN* (*MMAC-1*) codifica uma fosfatase que desfosforila fosfolipídeos com inositol, p.ex. o fosfatidilinositol trifosfato; portanto regula negativamente a via PI3-cínase/Akt. Os doentes com mutações germinativas deste gene têm a síndrome de Cowden, que se caracteriza pela presença de hamartomas múltiplos da pele, intestino, mama e tireóide. Cerca de 60 a 70% dos doentes com síndrome de Cowden têm nódulos da tireóide ou tireoidite, e cerca de 10% têm carcinomas da tireóide, principalmente carcinomas foliculares. Foram identificadas mutações do *PTEN*, embora raramente, em CP esporádicos.[103] É importante referir que a diminuição da expressão do *PTEN* sem mutação do gene parece ser bastante mais frequente: até 30 a 40% dos CP e carcinomas foliculares.[103]

Transportador de sódio-iodo

O transportador de sódio-iodo é outro alvo possível para diagnóstico e prognóstico. Num estudo com RT-PCR quantitativo mostrou uma diminuição significativa da sua expressão em CP relativamente a tecido tireoideu normal.[117]

Com o advento do uso dos "chips" de ADN é possível identificar o perfil de expressão génica dos tumores. Nos CP, apesar da heterogeneidade clínica, há um conjunto mais ou menos estável de alterações moleculares:[113,118] em geral há uma sobre-expressão de moléculas de adesão e uma sub-expressão de vários genes envolvidos na função tireoideia normal (p.ex. a tireo-peroxidase e a deiodinase da iodotironina). Alguns dos genes que se verificou, por esta técnica, estarem sobre-expressos não tinham sido anteriormente associados com CP nem com nenhum outro tumor da tireóide.

CITOGENÉTICA

Perissel et al. descreveram um caso de VFCP com alterações multi-clonais no cromossoma 22: a alteração principal foi a monossomia, foi também observada uma del(22)q(11) noutro clone, um idio(22) e uma der(17)t(?17;22) no quarto clone anormal.[119] A alteração do cromossoma 22 foi a única observada neste tumor. A região 22q11-12 contém genes importantes – bcr, NF 2 – e alterações desta região têm sido vistas noutros tumores: meningiomas, neurinomas, ependimomas e leucemia mielóide crónica. É importante salientar que não parecem existir alterações citogenéticas no cromossoma 22 em CPC – estas alterações poderão estar relacionadas com o "padrão folicular". No cromossoma 22 têm sido descritas alterações numéricas – mais frequentemente perdas – associadas a hiperplasias, adenomas da tireóide; estas alterações surgem quase sempre isoladas, ou em associação com outras alterações numéricas.

Num estudo de Roque et al. foram analisados 94 CP, dos quais 19 VFCP.[120] A moda do número de cromossomas foi quase-diplóide ou pseudo-diplóide em 34 dos 37 tumores com alterações clonais. Em 3 VFCP foram encontradas as seguintes alterações: um caso com del(11)(q13q13), outro com t(2,3)(q13;p25) e um caso com cariótipo hiperdiplóide, com polissomias dos cromossomas 3, 5, 7 9, 12, 14, 17 e 20. Estas alterações são encontradas frequentemente em adenomas foliculares e poderão, por isso, estar associadas a arquitectura folicular. Os adenomas foliculares e as lesões hiperplásicas podem apresentar trissomias dos cromossomas 5, 7, 9, 12, 14 e 16. Os carcinomas foliculares apresentam, por vezes, rearranjos no braço curto do cromossoma 3, com provável perda de material.[119]

OBJECTIVOS

Tendo em consideração a importância do diagnóstico da VFCP, nomeadamente o diagnóstico diferencial desta variante do CP com lesões tireoideias benignas, por um lado, e com o carcinoma folicular, por outro, foram os seguintes os objectivos que nos propusemos alcançar neste trabalho:

1 – Caracterização anátomo-patológica detalhada duma série de casos de VFCP arquivados no Registo Oncológico do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, com vista a melhorar a capacidade de reconhecimento morfológico desta variante.

2 – Contributo para uma maior eficácia no diagnóstico da VFCP mediante recurso a técnicas complementares (imunohistoquímica) utilizando "marcadores" com alguma utilidade já reconhecida.

3 – Comparação dos resultados obtidos com os descritos na literatura no sentido de testar a utilidade prática dos ditos marcadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados retrospectivamente todos os casos (57) de VFCP registados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João entre Junho de 1998 e Junho de 2002. Em todos os casos foram revistas as lâminas histológicas coradas com Hematoxilina & Eosina arquivadas no Registo Oncológico do Serviço, ou obtidos novos cortes de todos os blocos dos casos de que não foram encontradas lâminas. Foram registados os dados clínico-patológicos referentes a cada caso, a partir do respectivo relatório existente em arquivo no Serviço, ou mediante a observação microscópica das lâminas. Os dados recolhidos, para cada doente, foram: sexo, idade e tipo de cirurgia efectuada. Foram avaliadas as seguintes características da neoplasia: dimensões, presença de cápsula, extensão extra-tireoideia, padrão de crescimento predominante (folicular, sólido, trabecular, papilar), características nucleares e percentagem de núcleos típicos de CP, presença de invasão vascular, infiltrado linfóide intra-tumoral, metástases e multicentricidade/multifocalidade. Foram analisadas também outras lesões coexistentes no parênquima restante.

Foi realizado estudo imunohistoquímico em apenas 53 dos 57 casos, por não ter sido possível obter os blocos de parafina dos restantes 4 casos. No estudo imunohistoquímico foram usados anticorpos "para" sialyl Lewis x, CD10, galectina-3, HBME-1 e CK 19. A proveniência dos anticorpos e respectivas diluições constam no Quadro 1. Para todos os casos foram feitos cortes de 2μm a partir do material fixado em formol tamponado e incluído em parafina. Para a realização da técnica procedeu-se à hidratação em soluções com concentrações decrescentes de etanol, até à lavagem em água corrente. Depois de uma lavagem em PBS (phosphate buffered saline) procedeu-se, para os anticorpos que assim o exigem, a um pré-tratamento: para a galectina-3 e CD10 foi usada uma solução de recuperação antigénica comercial (DAKO®, Dinamarca) numa concentração a 10% (diluição em água destilada) em banho-maria, a 98ºC, durante 20 minutos. Para a CK19 usou-se uma solução de pepsina 0,4% em 1% de HCl, durante 20 minutos a 37ºC. Para os anticorpos HBME-1 e sialyl Lewis x não foi efectuado qualquer pré-tratamento. Em seguida, procedeu-se à inibição da peroxidase endógena com uma solução de H_2O_2 3% em metanol. A duração deste passo foi de 20 minutos para a galectina-3 e de 10 minutos para os restantes anticorpos. Com vista à diminuição da ocorrência de imunorreactividade inespecífica procedeu-se, em todas as lâminas, a uma incubação em soro de bloqueio proteico (UltraVisionblock – LabVision Corporation, Fremont, USA) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Foi efectuada, seguidamente, a incubação com o anticorpo primário, nas diluições referidas no Quadro 1. Com excepção do anticorpo primário sialyl Lewis x, cuja incubação decorreu "overnight" a 4ºC, os restantes anticorpos tiveram uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Todos os anticorpos primários foram diluídos com diluente (Labvision Corporation, Fremont, USA). Em seguida foi feita a incubação, durante 10 minutos, com o soro secundário biotinilado de cabra (LabVision Corporation, Fremont, USA). Seguiu-se uma incubação com estreptavidina-peroxidase (LabVision Corporation, Fremont, USA) durante 10 minutos. Finalmente, para a revelação da reacção, efectuou-se uma incubação com diaminobenzidina (DAB substrate/DAB

chromogen – LabVision Corporation, Fremont, USA) durante 10 minutos, após o que se procedeu a lavagem, contraste nuclear com Hematoxilina de Mayer e montagem das lâminas. Para todos os anticorpos foram usados simultaneamente controlos positivos e negativos. Como controlos positivos foram utilizados casos com imunorreactividade conhecida para cada um dos anticorpos, tendo os controlos negativos sido efectuados com a utilização de um anticorpo monoclonal da mesma sub-classe do respectivo anticorpo e em igual concentração.

	Laboratório	Clone	Diluição
Galectina-3	Novocastra	9C4	1:500
CD10	Novocastra	56C6	1:150
Sialyl Lewis x	Não comercial (cedência: Prof. Henrik Clausen, Dinamarca)	FH6	1:2
CK19	Chemicon	MAB3238	1:100
HBME-1	DAKO	HBME-1	1:50

Quadro 1 - Anticorpos usados e respectivas diluições

Os resultados do estudo imunohistoquímico foram avaliados em simultâneo por 2 patologistas. Foi feita uma avaliação semi-quantitativa segundo o seguinte esquema: –, ausência de células positivas; -/+, menos de 5% de células positivas; +, entre 5 e 25% de células positivas; ++, entre 25 e 50% de células positivas; +++, entre 50 e 75% de células positivas; ++++, mais de 75% de células positivas. Foi também verificada a localização celular do marcador imunohistoquímico e, nos casos de marcação focal, registou-se a respectiva localização dentro do tumor. Para todos os casos foi avaliada a intensidade da marcação (forte, moderada ou fraca).

RESULTADOS

Características clínico-patológicas

As características clínico-patológicas estão descritas detalhadamente no Quadro 2. Dos 57 doentes por nós estudados, 52 foram do sexo feminino e 5 do sexo masculino, o que corresponde a uma relação F:M de 10,4:1. A média de idades dos doentes foi de 47,4 anos, tendo o mínimo e o máximo sido, respectivamente, 22 e 76 anos de idade. A média dos valores da maior dimensão tumoral foi de 2,7cm, tendo o mínimo e o máximo sido, respectivamente, 0,5cm e 9cm. Observámos invasão vascular venosa em 8/57 casos, correspondendo a 14%. Observámos infiltrado linfóide intra-tumoral em apenas 3 casos. Foi observada uma cápsula completa em 15/57, correspondendo a 26,3%. Em 25/57 (43,9%) a cápsula era incompleta. Dezassete dos 57 casos (29,8%) não tinham cápsula. A presença de vários focos de CP (multifocalidade/multicentricidade) de arquitectura idêntica ou distinta foi detectada em 18/57, correspondendo a 31,6% dos casos. Identificámos extensão extra-tireoideia focal em 2/57 casos (3,5%). Foram isolados gânglios linfáticos em 8 casos, tendo sido observadas metástases em 3. Em relação ao padrão histológico, 37/57 casos tiveram o padrão "habitual" destes tumores (figuras 1 e 2). Quatro casos tiveram um padrão de tipo adenoma fetal (figura 3), 9 foram predominantemente de padrão microfolicular/sólido, 2 foram macro-microfoliculares e 1 macrofolicular. Este último foi re-classificado como variante macrofolicular. Os restantes 4 casos foram VFCP oxifílicas. Não se observaram alterações na tireóide restante em 18 casos. Nos outros casos estavam presentes uma ou mais das seguintes lesões: tireoidite linfocítica, bócio multinodular (colóide e/ou adenomatoso) e Histiocitose X (esta em apenas um caso).

Conseguimos identificar com segurança características nucleares típicas de CP em todos os casos, pelo que confirmámos o diagnóstico prévio. Estas características estavam presentes de uma forma difusa em 46 dos 57 casos. Nos outros onze casos houve diferentes tipos de dificuldade: em 6 casos os núcleos típicos de CP só estavam presentes em algumas áreas, em grupos de folículos, numa quantidade variável de células tumorais; as outras áreas, por vezes predominantes, eram de tipo adenomatoso, com núcleos mais pequenos, redondos e hipercromáticos. Quatro casos eram constituídos predominantemente por células oxifílicas, pelo que os núcleos não eram clarificados e apresentavam nucléolo. Finalmente, num caso o problema foi o diagnóstico diferencial com "carcinoma bem diferenciado, S.O.E" (figura 4).[36]

Não tivemos acesso à informação do exame citológico prévio em 17 casos. Nos casos com essa informação (todos os efectuados no nosso Serviço) foram os seguintes os diagnósticos: carcinoma papilar – 8 casos (2 sugerindo VFCP); sugestivo de carcinoma papilar – 13 casos (7 colocando o diagnóstico diferencial de "tumor folicular"); "tumor folicular" – 12 casos (4 sugerindo o diagnóstico); "suspeito" de lesão tumoral – 2 casos; inconclusivo/material insuficiente – 5 casos (2 sugerindo "tumor folicular").

	Sexo	Idade	Dimensão	Invasão Venosa	Multicêntrico	Cápsula	Gânglios
1	F	41	2,2	Não	Não	Sim	0/1
2	F	58	6,5	Não	Sim	Não	Não
3	F	54	2,6	Não	Não	Parcial	Não
4	F	29	2,0	Não	Não	Parcial	Não
5	F	45	4,8	Sim	Não	Parcial	Não
6	F	50	1,5	Não	Não	Parcial	Não
7	F	65	5	Sim	Não	Parcial	Não
8	F	67	2,7	Não	Não	Não	Não
9	F	53	3,5	Não	Sim	Não	Não
10	F	50	1,1	Não	Não	Sim	Não
11	F	61	1,5	Não	Não	Parcial	Não
12	F	53	2,6	Não	Sim	Parcial	Não
13	F	26	2,1	Não	Não	Sim	Não
14	M	54	2	Não	Não	Parcial	Não
15	M	65	4	Não	Sim	Não	1/1
16	F	38	2,4	Não	Não	Parcial	Não
17	F	76	1	Sim	Sim	Não	Não
18	F	61	1,6	Não	Não	Parcial	Não
19	F	34	2,8	Sim	Sim	Sim	Não
20	F	27	1,3	Não	Não	Sim	Não
21	F	57	1,5	Não	Não	Sim	Não
22	F	61	3	Não	Não	Parcial	Não
23	F	45	4,5	Não	Não	Sim	Não
24	F	55	2,1	Não	Não	Não	Não
25	F	24	2	Não	Sim	Parcial	Não
26	F	42	3	Não	Não	Sim	Não
27	F	62	3	Não	Não	Sim	Não
28	F	40	2,1	Não	Não	Parcial	Não
29	F	54	9	Sim	Sim	Parcial	Não
30	F	39	4,5	Não	Não	Parcial	Não
31	F	45	5	Não	Não	Sim	Não
32	F	44	2,7	Não	Não	Parcial	Não
33	F	36	1,2	Não	Sim	Não	6/15
34	F	49	5	Não	Não	Parcial	Não
35	F	56	2	Não	Não	Não	Não
36	F	52	1,2	Sim	Sim	Não	Não
37	M	34	2,8	Não	Não	Parcial	Não
38	F	44	1,2	Não	Não	Não	Não
39	F	34	0,7	Não	Sim	Não	1/1
40	F	33	4	Sim	Não	Sim	0/1
41	F	22	2	Não	Sim	Sim	Não
42	F	61	1,3	Não	Não	Não	Não
43	F	47	2,7	Não	Não	Parcial	0/1
44	M	49	4	Não	Sim	Não	Não
45	F	49	0,5	Não	Não	Não	0/1
46	F	58	3,1	Não	Sim	Não	Não
47	F	48	2,2	Não	Sim	Sim	Não
48	F	35	1,5	Não	Sim	Parcial	Não
49	F	52	1	Não	Não	Parcial	Não
50	F	53	1,7	Não	Não	Parcial	Não
51	F	36	0,9	Não	Não	Sim	Não
52	F	45	3,5	Não	Sim	Sim	Não
53	F	33	5	Não	Não	Parcial	0/2
54	F	36	3,5	Não	Não	Não	Não
55	F	58	2	Não	Não	Parcial	Não
56	F	47	2,5	Sim	Sim	Não	Não
57	M	57	2,5	Não	Não	Parcial	Não

Idade-anos
Dimensão-cm - do tumor clinicamente evidente ou, nos casos multifocais/multicêntricos, do maior tumor de arquitectura folicular

Quadro 2 – Características clínico-patológicas dos casos

	Padrão	Núcleos típicos	Tireóide restante	Citologia
1	Ad. fetal	Presenca difusa	TL	TF vs CP
2	Habitual	Presenca difusa	SA	TF
3	Habitual	Presenca difusa	SA	TF (VF?)
4	Mac/Mic	Presenca focal	SA	Não
5	Habitual	Presenca difusa	SA	Não
6	Ad. fetal	Presenca difusa	SA	Não
7	Habitual	Presenca difusa	B Col	Sug tumor
8	Habitual	Presenca difusa	TLN	Não
9	Habitual	Presenca difusa	TL, B Col	CP sug
10	Habitual	Presenca difusa	TL	TF vs VF
11	Sol/Trab	Presenca difusa	B Col	TF vs VF
12	Habitual	Presenca difusa	SA	CP
13	Mic/Mac	Presenca focal	SA	Não
14	Sol/Trab	Presenca difusa	B Ad	Insuf/Inc
15	Habitual	Presenca difusa	B Ad	Não
16	Mic/Sol	Presenca difusa	B Col, TL	CP
17	Sol/Mic	Presenca difusa	B Ad	TF vs CP
18	Mic/Sol	Presenca difusa	SA	Inc (TF?)
19	Sol/Trab	Presenca difusa	B Col	TF
20	Habitual	Presenca focal	TL	TF
21	Habitual	Presenca difusa	TL, B Col	CP sug
22	Habitual	Presenca difusa	B Ad	TF
23	Macro	Presenca difusa	SA	CP sug
24	Habitual	Presenca difusa	B Col, TL	TF sug
25	Micro	Presenca difusa	TL, NS	Não
26	Oxifílico	Presenca difusa	SA	CP
27	Oxifílico	Presenca difusa	B Col	Não
28	Micro	Presenca difusa	B Col	Não
29	Sol/Mic	Presenca difusa	B Col	TF vs CP
30	Oxifílico	Presenca difusa	TL	Não
31	Habitual	Presenca difusa	SA	Não
32	Habitual	Presenca difusa	B Col	Não
33	Habitual	Presenca difusa	TL	CP sug
34	Ad. fetal	Presenca difusa	SA	TF sug
35	Habitual	Presenca difusa	TL	CP
36	Habitual	Presenca difusa	TL	CP
37	Habitual	Presenca difusa	B Col	TF
38	Habitual	Presenca difusa	B Ad	TF
39	Habitual	Presenca difusa	TL	Não
40	Habitual	Presenca difusa	SA	Não
41	Habitual	Presenca focal	B Col	CP sug
42	Habitual	Presenca focal	B Col	Não
43	Habitual	Presenca difusa	B Ad, TL	VFCP
44	Habitual	Presenca difusa	TL	Inc
45	Habitual	Presenca difusa	B Col	Não
46	Habitual	Presenca difusa	SA	TF vs VF
47	Habitual	Presenca focal	B Col	Não
48	Habitual	Presenca difusa	SA	TF
49	Habitual	Presenca difusa	B Col, TL	TFH sug
50	Oxifílico	Presenca difusa	SA	CP (VF?)
51	Habitual	Presenca difusa	B Col	TF
52	Habitual	Presenca focal	B Ad	CP
53	Habitual	Presenca difusa	H X	TF sug
54	Habitual	Presenca difusa	SA	Sug tumor
55	Ad. fetal	Presenca difusa	B Col	Ins (TF sug)
56	Habitual	Presenca difusa	SA	Inc
57	Habitual	Presenca difusa	TL	CP sug

Padrão: Sol-sólido; Mic-microfolicular; Mac-macrofolicular; Trab-trabecular; Ad. fetal-adenoma fetal; NS-ninhos sólidos
Tireóide restante: SA-sem alterações; TL-tireoidite linfocítica; B Col-bócio colóide; B Ad-bócio adenomatoso; H X-histiocitose X.
Citologia: CP-carcinoma papilar; VF-variante folicular; TF-"tumor folicular"; sug-sugestivo de; Inc-inconclusivo; Ins-insuficiente.

Quadro 2 (continuação)

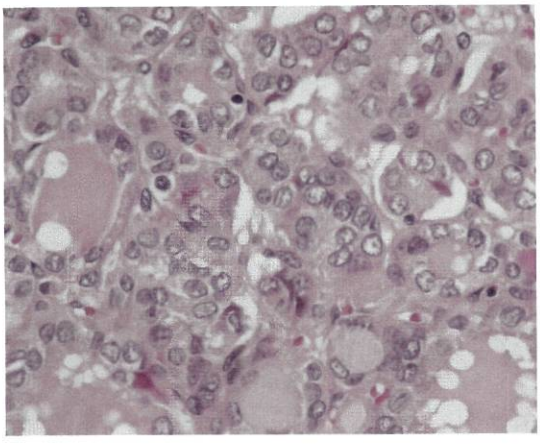


Figura 1 – VFCP, padrão habitual (HE-400x)

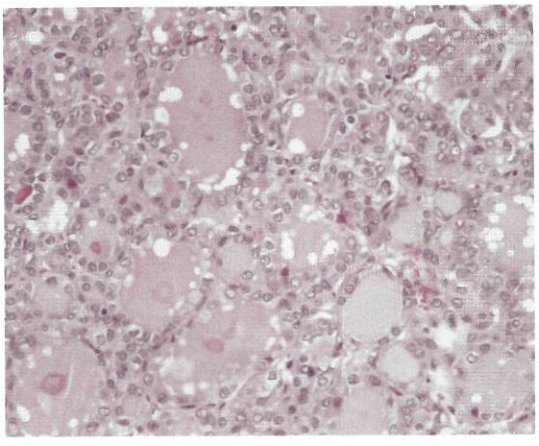


Figura 2 – VFCP, padrão habitual (HE-200x)

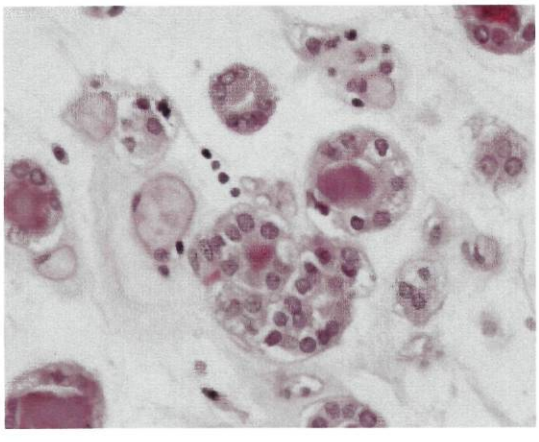


Figura 3 – VFCP, padrão de tipo adenoma fetal (HE-400x)

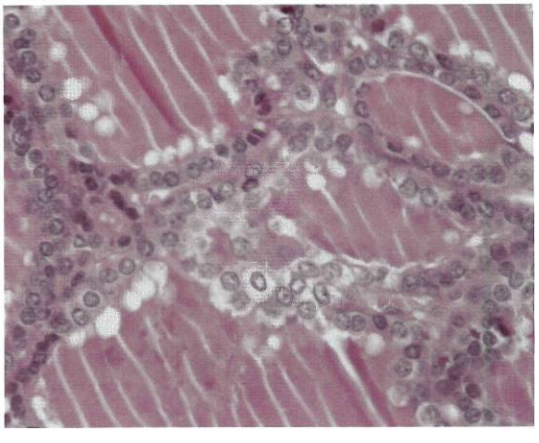


Figura 4 – VFCP (d.d. com carcinoma SOE) (HE-400x)

Características imunohistoquímicas

Os resultados obtidos no estudo imunohistoquímico estão resumidos nos Quadros 3 e 4.

Sialyl Lewis X

Não se observou expressão deste antigénio em 29 dos 53 casos estudados. Dos casos positivos, 12 mostraram expressão de sialyl Lewis x em menos de 5% das células tumorais, 8 expressaram-no em 5 a 25% das células, 3 em 25 a 50% das células e um caso em 50 a 75% (figura 5). Nenhum tumor teve expressão de sialyl Lewis x em mais de 75% das células. No parênquima tireoideu restante, incluindo o adjacente aos tumores, não foi observada expressão de sialyl Lewis x. Foram estudados 12 casos multicêntricos. Em 6 deles houve uma variabilidade moderada na marcação dos diferentes focos tumorais para este anticorpo: desde um caso que variou entre negativo e menos de 25% de células positivas, até 2 casos que variaram entre 0 e 50-75% de células positivas.

CD10

Quarenta e oito casos não mostraram expressão deste antigénio. Dos restantes casos, 3 apresentaram expressão de CD10 em menos de 5% das células tumorais, 1 expressou-o em 5 a 25% das células e outro caso teve expressão de CD10 em 50 a 75% das células (figura 6). No parênquima adjacente aos tumores foi observada apenas expressão muito focal de CD10. Nos casos multicêntricos não houve variabilidade assinalável: apenas entre negativo e menos de 5% das células positivas, em 3 casos. A marcação para o CD10 foi fraca em todos os casos positivos.

Galectina-3

Observou-se expressão da galectina-3 em 27 casos, sempre com intensidade moderada a forte. Quatro casos mostraram expressão de galectina-3 em menos de 5% das células tumorais, 10 casos expressaram-na em 5 a 25% das células, 2 casos em 25 a 50% das células, 5 casos em 50 a 75% das células e 6 casos expressaram-na em mais de 75% das células tumorais (figura 7). No parênquima adjacente aos tumores foi observada expressão focal de galectina-3, em relação com focos de tireoidite linfocítica. Em 6 dos 12 casos multifocais houve variabilidade assinalável, que foi desde negativo a 25 a 50%

de células positivas num caso, e desde negativo a 75-100% de células positivas em 2 casos. Os vinte e seis casos restantes não mostraram expressão deste antigénio.

HBME-1

Foi detectada expressão de HBME-1 em 42 casos, em todos eles com intensidade forte. Cinco casos mostraram expressão de HBME-1 em menos de 5% das células tumorais, 4 casos expressaram-no em 5 a 25% das células, 7 casos em 25 a 50% das células, 6 casos em 50 a 75% das células e 20 casos expressaram-no em mais de 75% das células (figura 8). No parênquima adjacente aos tumores foi observada expressão focal de HBME-1 em 3 casos, em relação com focos de tireoidite linfocítica. Quatro dos 12 casos multifocais mostraram variabilidade assinalável: um deles entre 25-50% e 75-100% de células positivas, os outros três entre negativo e 75-100% de células positivas. Não se observou expressão de HBME-1 nos restantes onze casos.

Citoqueratina 19

Observou-se expressão de CK19 em 48 casos, com intensidade de marcação forte. Quatro casos tiveram expressão de CK19 em menos de 5% das células tumorais, cinco em 5 a 25% das células, 2 casos em 25 a 50% das células, 6 em 50 a 75% das células e 31 casos mostraram marcação em mais de 75% das células (figura 9). Na maioria dos casos, no parênquima adjacente aos tumores observou-se marcação para CK 19 com intensidade variável, de fraca a intensa e com localização também variável, não só próximo como também afastada dos tumores. Nos casos multifocais, apenas se observou variabilidade moderada em 2 casos: entre 25-50% e 75-100% de células positivas num caso e entre menos de 25% e 75-100% de células positivas no outro. Em 3 casos houve uma variabilidade ligeira (de menos de 25% a 25-50% de células positivas e de 50-75% a 75-100% de células positivas). Quatro casos foram negativos. Num caso não se procedeu ao estudo devido a motivos de ordem técnica.

	Negativo	-/+	+	++	+++	++++
Sialyl Lewis x	29	12	8	3	1	0
CD10	48	3	1	0	1	0
Galectina-3	26	4	10	2	5	6
HBME-1	11	5	4	7	6	20
Citoqueratina 19*	4	4	5	2	6	31

* - Não foi possível graduar um caso

Quadro 3 – Resumo das características imunohistoquímicas

Multifocais	Sialyl-Lewis X	CD10	Galectina-3	HBME-1	Citoqueratina 19
Caso 9 (fol)*	-/+	-	+++	+++	++++
Caso 9 (fol)	-/+	-/+	++	+++	++++
Caso 9 (fol)	-/+	-	+	++++	++++
Caso 12 (fol)*	-/+	-	-	++++	++++
Caso 12 (fol)	-	-	-/+	++	++++
Caso 12 (fol)	++	-	++	-	++++
Caso 12 (fol)	-	-	-	++++	++++
Caso 15 (fol)*	+	-	++++	++++	++++
Caso 15 (fol)	-	-	-	++++	+++
Caso 17 (fol)*	-	-	-	++++	+++
Caso 17 (fol)	-/+	-	-	-	++++
Caso 25 (fol)*	-	-	++++	+++	++++
Caso 25 (pap)	+++	-	++++	++++	++++
Caso 36 (fol)*	-	-	+++	++++	++++
Caso 36 (fol)	+	-	++++	++++	++++
Caso 36 (fol)	-	-	++++	++++	++++
Caso 36 (pap)	-/+	-/+	+++	++	++++
Caso 39 (fol)*	-	-	-	-	+
Caso 39 (pap)	-/+	-	++++	++++	++++
Caso 39 (pap)	+	-	-	+++	++++
Caso 44 (fol)*	-	-	++++	++++	++++
Caso 44 (fol)	-	-	+++	++++	++++
Caso 46 (fol)*	+	-	++	++++	++
Caso 46 (fol)	+	-	+	++++	+++
Caso 46 (fol)	-	-	++++	++++	++++
Caso 47 (fol)*	+	-	-	+	++++
Caso 47 (fol)	-/+	-	+	++	Não
Caso 48 (fol)*	-	-	+	++++	++
Caso 48 (fol)	+++	-	+++	++++	+
Caso 56 (fol)*	-	-	++++	+	++++
Caso 56 (pap)	-	-	++++	+	++++

* Foco tumoral principal (cujas características clínico-patológicas estão descritas no Quadro 2)

Quadro 4 – Características imunohistoquímicas dos casos multifocais

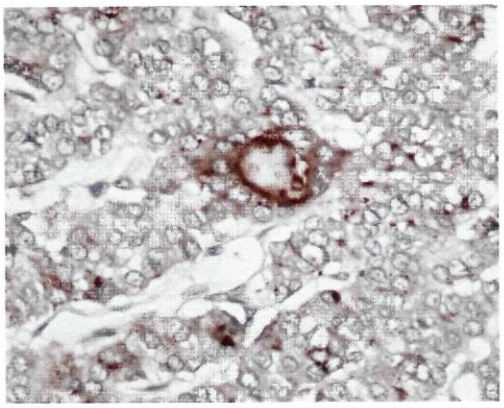


Figura 5 – Sialyl Lewis x, caso 19

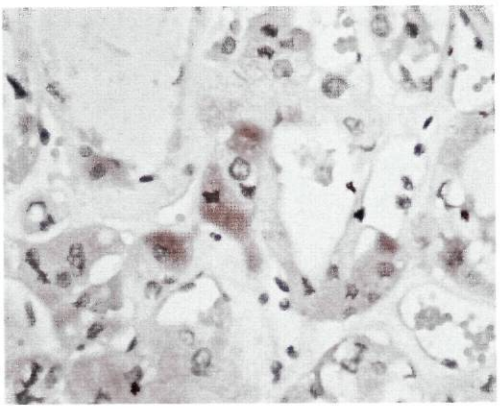


Figura 6 – CD10, caso 30

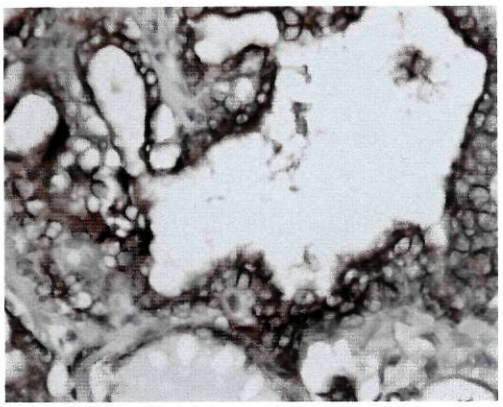


Figura 7 – Galectina-3, caso 21

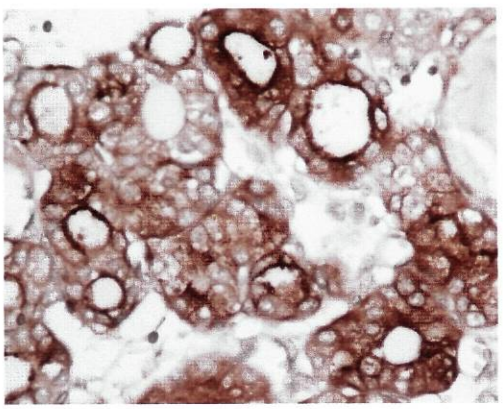


Figura 8 – HBME-1, caso 11

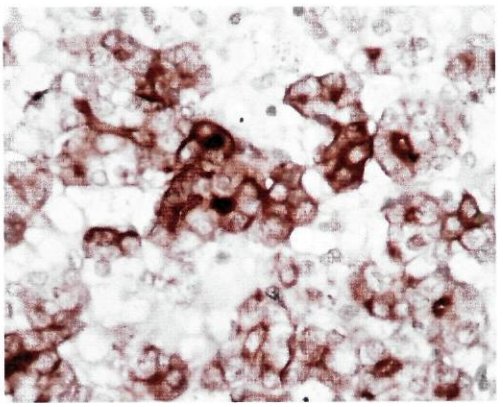


Figura 9 – Citoqueratina 19, caso 13

DISCUSSÃO

A VFCP é a variante mais comum de CP. O seu diagnóstico depende da presença das características nucleares de CP num tumor de arquitectura folicular. Se bem que, de uma maneira geral, o diagnóstico desta entidade não seja difícil, em alguns casos é-o, seja porque o aspecto dos núcleos não é totalmente típico de CP, ou porque os núcleos típicos estão presentes em apenas algumas áreas da lesão. Dado que as dificuldades podem chegar ao ponto de quase impedir o diagnóstico diferencial entre a VFCP e uma lesão benigna adenomatosa, a procura de marcadores (imunohistoquímicos, entre outros) que permitam distinguir claramente estes dois tipos de lesão tem sido um ponto fulcral de muita investigação em patologia tireoideia. O nosso trabalho pretendeu, assim, alargar diversos estudos existentes que apontam alguns marcadores imunohistoquímicos como tendo potencial utilidade prática no diagnóstico do CP. Optámos pela VFCP como modelo de estudo porque é esta a entidade que mais frequentemente ocasiona os referidos problemas de diagnóstico. A selecção dos marcadores utilizados teve em conta experiências prévias do nosso e outros grupos (ver detalhes na Introdução). Nos parágrafos que se seguem iremos, pois, comparar os nossos resultados com os descritos na literatura, com especial incidência sobre os resultados do estudo imunohistoquímico que efectuámos.

A média de idades dos doentes com VFCP que observámos na nossa série – cerca de 47 anos – é idêntica à descrita na literatura.[11,43] Já a relação F:M está muito desviada, com uma proporção de cerca de 10 mulheres para cada homem. Apesar de na patologia tireoideia em geral, haver um predomínio de mulheres, nos doentes com VFCP a relação F:M é, de acordo com os relatos existentes, de 2,8 a 4/1. Mesmo Mizukami et al., que encontraram uma relação superior ao habitual numa população japonesa - 7/1 - não observaram um valor tão elevado.[11] Ivanova et al., numa série de 18 casos, em que 10 foram VFCP difusas, foram quem mais se aproximou dos nossos valores.[19] Estes autores encontraram uma relação F:M de 8,5:1 (9:1 em VFCP difusas, e os 8 casos de VFCP foram todos em mulheres). Nós não encontramos qualquer explicação para este predomínio "excessivo" de mulheres com VFCP na nossa série.

Em relação à maior dimensão do tumor, a média dos valores foi, na nossa série, de 2,7cm, valor que não difere do que é referido em grande parte das séries publicadas. No entanto, Tielens et al. referiram 1,2cm de média e Carcangiu et al. referiram que 25% dos casos da sua série tinham menos de 1cm de diâmetro.[10,12] Na nossa série apenas 3 casos tinham dimensões inferiores a 1cm. Observámos invasão vascular venosa em 14% dos casos da nossa série. Este valor é semelhante ao referido na literatura. Também a presença de cápsula completa em 26,3% dos nossos casos está apenas ligeiramente abaixo do valor que é referido, por exemplo, no livro da OMS,[2] onde se pode ler que cerca de um terço dos casos de VFCP são encapsulados. A percentagem de casos com múltiplos focos de CP, que foi de 31,6% na nossa série, é também idêntica ao referido por outros.[12,16,43] A frequência de extensão extra-tireoideia é muito baixa, na nossa série, apenas 2/57 casos (3,5%). Este valor é inferior ao referido na maior parte das séries estudadas e poderá indicar um "viés" dos casos por nós estudados no sentido de uma

menor agressividade, traduzida num estadio pouco avançado da neoplasia nos doentes operados no nosso Hospital. No entanto, o tempo de seguimento dos doentes é, ainda, muito curto para confirmar (ou infirmar) esta hipótese. Considerando os casos com metastização ganglionar é de salientar, em primeiro lugar, que o valor deste parâmetro foi prejudicado pelo número relativamente baixo de doentes a quem que foram retirados gânglios linfáticos – 8 casos. Isto sucedeu devido a não ser, hoje em dia, prática corrente a execução de esvaziamento ganglionar aquando da cirurgia, a não ser quando se detectam gânglios aumentados de tamanho. Mesmo nos doentes a quem foi feita linfadenectomia, só a um doente foram retirados mais de 2 gânglios. Dos 8 doentes, 3 tiveram metástases ganglionares. Este valor é compatível com o referido na literatura havendo, no entanto, a dizer que os valores de outros estudos são muito variáveis – de 0 a 86%.[11,40,43] Isto reflecte, provavelmente, a extensão da dissecção ganglionar cirúrgica.

Sobre a identificação das características nucleares, é importante referir que ela não foi difícil na maioria dos casos. A observação de um elevado número de casos de VFCP em pouco tempo contribuiu seguramente para a melhoria da nossa acuidade de diagnóstico, sendo muito provavelmente a razão para uma relativa facilidade na identificação das características nucleares de CP em tumores com arquitectura folicular. No entanto, 11 casos foram mais difíceis de reconhecer. O problema com que mais frequentemente nos confrontámos foi o da multifocalidade das características nucleares de CP: os tumores tiveram um aspecto de nódulo colóide ou de adenoma folicular em pequena ampliação e apenas com uma observação mais cuidadosa foi possível identificar claramente várias áreas contendo folículos com núcleos típicos. No nosso estudo considerámos VFCP a totalidade do tumor e não apenas estas áreas. Esta é a solução mais prática, e a defendida por Baloch et al. e Rosai et al.,[34,36] em detrimento da outra possibilidade, que é a de considerar como CP apenas os focos típicos podendo, assim, haver múltiplos carcinomas de reduzidas dimensões. Este problema não está, contudo, solucionado e levanta questões sérias ao cirurgião no que respeita à extensão da tireoidectomia e/ou á terapêutica complementar a utilizar. Os 4 casos que considerámos como VFCP de células oxifílicas constiuíram outro problema de diagnóstico. Convém salientar, antes do mais, que a última edição do livro da OMS sobre a classificação dos tumores da tireóide não individualiza os carcinomas de células oxifílicas,[2] considerando que estes podem pertencer ao grupo dos CP ou ao grupo dos carcinomas foliculares. Nos nossos casos, apesar de os núcleos terem uma cromatina mais densa e nucléolo, dificultando o diagnóstico, a presença de irregularidade nuclear marcada, fendas e pseudo-inclusões foi suficiente para efectuarmos o diagnóstico de CP (VFCP, devido ao padrão) de células oxifílicas. O caso em que se colocou como diagnóstico diferencial o "carcinoma bem diferenciado S.O.E." é paradigmático do problema das características nucleares.[36] Em primeiro lugar, classificámo-lo como carcinoma devido à existência de invasão capsular. O problema foi a dificuldade em considerar as suas características nucleares suficientes para efectuar um diagnóstico de CP: os núcleos eram grandes e clarificados, mas sem muita irregularidade nem presença habitual de fendas. Achámos, no entanto, que as características nucleares "tendiam" mais para o CP do que para o carcinoma folicular, pelo que optámos pelo diagnóstico de VFCP. O facto de este doente ter um outro foco de CP foi útil na ponderação do diagnóstico.

Em relação ao diagnóstico citológico, este foi de CP em 8/40 casos (20%), sugerindo VFCP em 2 destes casos. No entanto, se se considerar também os 13 casos em que o diagnóstico foi de "sugestivo de carcinoma papilar" essa percentagem sobe para 52,5% de diagnósticos correctos na citologia. Esta baixa sensibilidade do exame citológico no diagnóstico de CP (e especificamente de VFCP) é referida quase constantemente na literatura.[4,12,14] Tielens et al. obtiveram um valor de 75% de sensibilidade na detecção de VFCP porque incluíram os casos "sugestivo de CP (ou de VFCP)" nos verdadeiros positivos.[12] Se esses casos forem excluídos, a diferença em relação aos nossos valores diminui: a sensibilidade no diagnóstico seguro de VFCP passa para 31%, enquanto que nós obtivemos um valor de 20%. Lin et al. obtiveram uma sensibilidade de 25%,[14] ao passo que Nair et al. observaram um valor ainda menor: 13,6%.[4] É de referir, ainda, que na nossa série foi efectuado o diagnóstico de "tumor folicular" (ou sugestivo de "tumor folicular") em 12 casos (30%). Mais uma vez interessa salientar que este diagnóstico, se bem que seja uma "infra-estimação", levou a uma tratamento cirúrgico da lesão. Finalmente, os casos inconclusivos ou com material insuficiente foram 5 (12,5%). Este valor é inferior ao obtido por Nair et al. (31,8%), sendo semelhante ao geralmente referido na literatura. No entanto, é de assinalar que em dois destes cinco casos se colocou a hipótese de se tratar de um "tumor folicular".

Dos 53 casos que estudamos com o anticorpo para o **sialyl Lewis x**, 29 (55%) não mostraram expressão do antigénio. Nos restantes, a positividade foi focal, tendo apenas um caso mostrado expressão em mais de 50% das células. Doze casos tiveram expressão muito focal, em menos de 5% das células. Portanto, cerca de 75% dos casos praticamente não tiveram expressão de sLex. Estes resultados são substancialmente diferentes dos obtidos por outros autores, inclusive do nosso grupo.[95,98] De facto, Fonseca et al. observaram positividade difusa em 27 casos de CP, incluindo 5 VFCP.[95] Além disso, estes autores voltaram a observar marcação franca para este antigénio, noutro trabalho. Aqui, novamente todos os casos de CP – 10 CPC e 14 CP dentro de adenoma/bócio – foram positivos para sLex.[98] Esta diferença não é fácil de explicar: o anticorpo é o mesmo, bem como os restantes procedimentos técnicos. O facto de o anticorpo não ser comercial poderá ajudar a explicar as diferenças, já que não há uma homogeneidade tão grande entre lotes diferentes. A exclusividade de VFCP no nosso estudo, ao contrário de estudos anteriores, também não parece ser a justificação para a diferença nos resultados, já que as 5 VFCP do 1º estudo de Fonseca et al. foram todas difusamente positivas.[95] Poder-se-ia especular que os tumores da série em estudo que não expressam sLex seriam menos agressivos e menos invasivos do que os que o expressam. No entanto, a comparação com os casos positivos deste e doutros trabalhos fica prejudicada pelo tempo curto de seguimento. A possibilidade de o sLex ser um marcador de malignidade em lesões foliculares da tireóide com áreas "suspeitas" de CP não se confirma nesta série.

Os nossos resultados foram substancialmente diferentes dos apresentados naquele que é, aparentemente, o único artigo publicado até hoje sobre a expressão de **CD10** em tumores do epitélio folicular da tireóide. Na nossa série, 48 casos (91%) foram negativos. Dos restantes casos, 3 expressaram CD10 focalmente, em menos de 5% das células, e um caso teve expressão em 5 a 25% das células. No caso restante observámos

positividade em 50 a 75% das células. Não houve casos com expressão de CD10 em 25 a 50% nem em mais de 75% das células. Ao invés, Tomoda et al. observaram expressão em 7 de 9 VFCP e em 8 de 10 carcinomas foliculares.[74] Todos os CPC, adenomas foliculares e bócios adenomatosos estudados por estes autores foram negativos. Intrigados com estes resultados, que parecem apontar claramente para a expressão preferencial de CD10 em tumores de arquitectura folicular (sejam CP ou foliculares), decidimos estudar a expressão deste anticorpo em 2 casos de CPC (não incluídos neste estudo). Em ambos se observou positividade multifocal de forte intensidade, localizada preferencialmente na superfície apical das células. O anticorpo que utilizámos foi o mesmo de Tomoda et al., tendo a diluição sido de 1:150, ou seja, três vezes maior do que a utilizada por estes autores. No entanto, dada a positividade que observámos nos CPC, não nos parece que a diluição menor usada por nós em relação a Tomoda et al. seja explicação para a diferença nos resultados obtidos nos nossos casos de VFCP. No parênquima normal não observámos expressão de CD10, tal como Tomoda et al. É necessário estudar uma série maior de casos de vários tipos de lesões da tireóide para tirar conclusões quanto à utilidade do CD10 no diagnóstico em patologia tireoideia.

Vinte e seis casos da nossa série (49%) não expressaram **galectina-3**. Este valor é muito mais alto do que o obtido por Bartolazzi et al. e Beesley et al. e aproxima-se da percentagem de casos negativos obtida por Herrmann et al.[70,77,78] Os 27 casos positivos da nossa série tiveram marcação variável: em 4 observou-se expressão focal de galectina-3, em menos de 5% das células, 10 casos tiveram expressão em 5 a 25% das células, e 2 casos em 25 a 50% das células. Cinco casos mostraram positividade em 50 a 75% das células e apenas seis casos em mais de 75% das células. Os resultados descritos na literatura são um pouco díspares, o que poderá ter que ver com os diferentes anticorpos utilizados (policlonal ou monoclonal, este último contra a proteína humana ou contra a proteína murina) e com os sistemas de detecção utilizados (avidina-biotina ou digoxigenina).[78] Assim, nos primeiros trabalhos, a marcação para galectina-3 foi quase exclusiva de carcinomas, tendo sido negativa em praticamente todas as lesões benignas da tireóide. Nestes estudos foram usados anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína murina, que tinham reactividade cruzada contra a galectina-3 humana.[79,80,81] No trabalho em que foi usado um anticorpo policlonal contra a proteína humana os resultados foram idênticos.[75] Neste estudo nenhuma lesão benigna mostrou expressão de galectina-3. Todos os CP (incluindo 2 VFCP) foram positivos. Num estudo multicêntrico (que é, de longe, o maior efectudo com a galectina-3) em que foi utilizado um anticorpo monoclonal comercial contra a galectina-3, os resultados voltaram a ser muito semelhantes, com uma correlação quase perfeita entre carcinomas/positividade e lesões benignas/negatividade.[77] No entanto, em 2 artigos de 2002 houve uma mudança: Beesley et al. encontraram casos de CP negativos (4/26, incluindo 1 VFCP).[70] Todos os carcinomas foliculares foram positivos. Além disso, 2/20 casos de adenoma folicular e 3/8 de bócio também foram positivos, chegando a marcação a ser forte. No outro artigo de 2002, Herrmann et al. (com um anticorpo monoclonal contra a proteína humana) usaram um sistema de detecção com digoxigenina, pois consideraram que o sistema habitual, com biotina, tinha marcação inespecífica em vários casos, mesmo nos controlos negativos.[78] Com o sistema de detecção contendo digoxigenina, 10/15 VFCP foram negativas, assim como 2/14 casos

de CPC e 4/11 casos de carcinoma folicular (3 deles de células de Hürthle). Além disso, 3/8 casos de adenoma folicular (incluindo 2 de células de Hürthle) foram positivos, ainda que focalmente. Portanto, Herrmann et al. e Beesley et al. concluíram que a galectina-3 é útil na distinção benigno/maligno, mas não é completamente específica. A percentagem de casos negativos - 49% - por nós observada é surpreendente, até porque usámos o sistema convencional de detecção com biotina. Estes valores não são coerentes com a hipótese de a galectina-3 ser um marcador (seja causando, seja como consequência) da progressão benigno/maligno em VFCP, como foi sugerido na progressão adenoma/carcinoma folicular.[70] É, no entanto, de referir que a progressão para malignidade é diferente nos CP, pois não se encontrou uma lesão benigna que seja equivalente ao adenoma folicular. Em relação ao papel da galectina-3 na capacidade de invasão tumoral, ele não parece ser importante num número significativo de casos da nossa série. Novamente, e tal como referimos anteriormente para o sLex, o número elevado de casos com ausência de expressão de galectina-3 levanta a possibilidade de os casos da presente série serem menos agressivos clinicamente. Mais uma vez, no entanto, o curto tempo de seguimento impede-nos de tecer considerações seguras a esse respeito. Nos casos que estudámos não observámos expressão de galectina-3 em parênquima tireoideu normal, tal como é referido na generalidade dos trabalhos publicados, mas encontrámos células endoteliais positivas, igualmente como esperado.

Na nossa série, 42 casos (79%) foram positivos para **HBME-1**. À semelhança dos resultados obtidos por outros autores,[82] a marcação foi variável, com predomínio das categorias de positividade mais difusa. Assim, a marcação para HBME-1 foi de mais de 75% das células em 20 casos e de 50 a 75% das células em 6 casos. Sete casos foram positivos em 25 a 50% das células, 4 casos foram positivos em 5 a 25% das células e 5 casos tiveram marcação focal, em menos de 5% das células. Os dados da literatura são um pouco díspares: enquanto Miettinen et al. e van Hoeven et al. referem marcação para HBME-1 em todos os CP e foliculares que estudaram,[82,84] Sack et al. referem 5/7 CP e 1 carcinoma folicular com marcação, e Cheung et al. descrevem pouco mais de 50% de casos positivos.[68,83] Apenas Cheung et al. descrevem especificamente a VFCP: 38/84 casos (45%) positivos, pouco mais de metade do valor por nós observado. Não é possível comparar a quantidade de células positivas nos nossos casos com os da série de Cheung et al., já que estes autores não fizeram essa semi-quantificação.[68] Em relação à marcação de lesões benignas também há disparidades, e bastante importantes: enquanto que Cheung et al. não observaram marcação destas lesões com o HBME-1, os outros autores referem marcação focal em alguns casos. Apenas 11 casos da nossa série não tiveram marcação para HBME-1, o que representa menos do que na série de Cheung et al.,[68] embora sem atingir a sensibilidade de 100% descrita por Miettinen et al. e por van Hoeven et al.[82,84] A discussão do significado biológico da expressão de HBME-1 é muito prejudicada logo à partida pelo simples facto de ainda não se saber exactamente qual o epítopo antigénico que é reconhecido pelo anticorpo. No entanto parece claro que, na tireóide, a positividade para este antigénio está associada predominantemente (mas não exclusivamente) a carcinomas. No parênquima normal não observámos marcação, tal como outros autores.[82] Os nossos resultados apontam, assim, para a utilidade do HBME-1 no diagnóstico da VFCP.

No que diz respeito à **Citoqueratina 19**, 48 casos (92%) foram positivos, tendo 31 casos (60%) tido mais de 75% das células positivas. Os resultados publicados até hoje sobre a CK19 são bastante consistentes e concordantes com os nossos: a esmagadora maioria dos CP é positiva. No nosso estudo encontrámos valores um pouco mais variáveis de expressão de CK19 do que o referido habitualmente para as VFCP: em 9 casos observámos marcação em menos de 25% das células, tendo 4 destes casos apresentado marcação em escassas células. Os outros 8 casos expressaram CK19 em 25 a 75% das células. A intensidade de marcação foi moderada a intensa na grande maioria dos casos. Nas séries referidas na literatura, foi descrito apenas um caso de VFCP negativo para CK 19,[69] se exceptuarmos o estudo de Cheung et al.,[68] em que 36 casos (43%) foram negativos. No nosso estudo, 4 casos foram negativos, portanto um número bastante abaixo dos resultados de Cheung et al., embora mais elevado do que na maior parte dos trabalhos. Na comparação entre VFCP e CPC a extensão e intensidade de marcação foram idênticas, segundo alguns autores.[67,69,70] Outros observaram menor intensidade em VFCP.[40] Foi, também, observado um número ligeiramente maior de casos de VFCP negativos.[68,69] A marcação nas VFCP foi normalmente intensa nos estudos anteriores, mas menos intensa se comparada com o grupo dos CPC da série de Baloch et al.[40] Sahoo et al. encontraram um caso de VFCP com menos de 25% das células positivas.[66] Com base em todos estes resultados, podemos concluir que a CK19 tem uma sensibilidade elevada no diagnóstico de CP, incluindo VFCP. No entanto, tal como em relação a outros marcadores, a sua especificidade não é total. Independentemente das pequenas diferenças verificadas em relação a outros autores, os nossos resultados fornecem suporte às observações anteriores, indicando a CK19 como um marcador útil no diagnóstico de CP ou, mais precisamente, da VFCP. É ainda de referir que, tal como em estudos anteriores a tireóide normal também mostrou,[40,64,66,67] na nossa série, marcação variável para CK 19: ténue nalguns casos, mais intensa noutros, e quer na proximidade quer afastada das lesões. Igualmente de acordo com resultados anteriores,[40,67] também observámos maior intensidade de marcação em áreas de tireoidite linfocítica.

Da análise dos nossos resultados imunohistoquímicos nos casos com múltiplos focos de carcinoma não pudemos retirar qualquer conclusão sobre a possibilidade de os ditos focos representarem o mesmo carcinoma (multifocalidade) ou outros carcinomas (multicentricidade). Com efeito, se nalguns casos a marcação imunohistoquímica foi semelhante (a sugerir multifocalidade), noutros o fenótipo imunohistoquímico foi diferente nos vários nódulos (a sugerir multicentricidade). Esta questão – multicentricidade vs multifocalidade – não é nova e tem suscitado muito interesse (e discórdia). Alguns autores pensam que a presença de múltiplos focos de CP representa disseminação multifocal (ou metastização intra-glandular) de um só tumor primário.[31] Mais recentemente, no entanto, Sugg et al. demonstraram que os diferentes focos intra-glandulares de CP tinham rearranjos RET/PTC diferentes, na maior parte dos doentes estudados. Este facto parece apontar para um predomínio da existência de múltiplos focos independentes de CP, isto é, multicentricidade.[121]

CONCLUSÕES

O trabalho que efectuámos na nossa série de casos de VFCP permitiu-nos chegar às seguintes conclusões:

– As características clínico-patológicas das VFCP por nós estudadas são idênticas às descritas na generalidade dos estudos existentes, excepção feita à proporção relativa entre mulheres e homens: o predomínio de mulheres na nossa série é maior do que o habitualmente descrito.

– Nos casos em que o diagnóstico histológico de VFCP é difícil, o recurso a marcadores imunohistoquímicos, nomeadamente o HBME-1 e a citoqueratina 19, é útil como adjuvante no diagnóstico. No entanto, a sensibilidade destes marcadores não é total, uma vez que há casos típicos de carcinoma que são negativos. Por outro lado, pode ser observada positividade (embora geralmente mais fraca e focal) em lesões benignas.

– Os outros marcadores imunohistoquímicos que estudámos – sialyl Lewis x, CD10 e galectina-3 – não parecem ser tão úteis, dado o elevado número de casos de VFCP negativos para estes marcadores. A este respeito fica, contudo, por explicar por completo a disparidade entre o nosso e outros trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Baloch ZW, LiVolsi VA. Etiology and significance of the optically clear nucleus. *Endocr Pathol* 2002;13:289-299

[2] Tumours of Endocrine Organs. World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of the Thyroid and Parathyroid. 2004;*in press*

[3] Chan JK. Tumors of the thyroid and parathyroid glands. In Fletcher CDM ed., Diagnostic Histopathology of Tumors, 2nd edition, Churchill Livingstone, 2000:963

[4] Nair M, Kapila K, Karak AK, Verma K. Papillary carcinoma of the thyroid and its variants: a cytohistological correlation. *Diagn Cytopathol* 2001;24:167-173

[5] Mesonero CE, Jugle JE, Wilbur DC, Nayar R. Fine-needle aspiration of the macrofollicular and microfollicular subtypes of the follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer* 1998;84:235-244

[6] Mills SE, Allen MS Jr. Congenital occult papillary carcinoma of the thyroid gland. Hum Pathol 1986;17:1179-1181

[7] Franssila KO. Is the differentiation between papillary and follicular thyroid carcinoma valid? *Cancer* 1973;32:853-864

[8] LiVolsi VA. Papillary neoplasms of the thyroid. Pathologic and prognostic features. *Am J Clin Pathol* 1992;97:426-434

[9] Isarangkul W. Dense fibrosis. Another diagnostic criterion for papillary thyroid carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:645-646

[10] Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J. Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer* 1985;55:805-828

[11] Mizukami Y, Noguchi M, Michigishi T, Nonomura A, Hashimoto T, Otakes S, Nakamura S, Matsubara F. Papillary thyroid carcinoma in Kanazawa, Japan: prognostic significance of histological subtypes. *Histopathology* 1992;20:243-250

[12] Tielens ET, Sherman SI, Hruban RH, Ladenson PW. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer* 1994;73:424-431

[13] Kumar PV, Talei AR, Malekhusseini SA, Monabati A, Vasei M. Follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid. A cytologic study of 15 cases. *Acta Cytol* 1999;43:139-142

[14] Lin HS, Komisar A, Opher E, Blaugrund SM. Follicular variant of papillary carcinoma: the diagnostic limitations of preoperative fine-needle aspiration and intraoperative frozen section evaluation. *Laryngoscope* 2000;110:1431-1436

[15] Bell CD, Coire C, Treger T, Volpe R, Baumal R, Fornasier VL. The "dark nucleus" and disruptions of follicular architecture: possible new histological aids for the diagnosis of the follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid. *Histopathology* 2001;39:33-42

[16] Zidan J, Karen D, Stein M, Rosenblatt E, Basher W, Kuten A. Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 2003;97:1181-1185

[17] Sobrinho-Simões M, Soares J, Carneiro F, Limbert E. Diffuse follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid: report of eight cases of a distinct aggressive type of thyroid tumor. *Surg Pathol* 1990;3:189-203

[18] Ivanova R, Soares P, Castro P, Sobrinho-Simões M. Diffuse (or multinodular) follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of ten cases of an aggressive form of differentiated thyroid carcinoma. *Virchows Arch* 2002;440:418-424

[19] Albores-Saavedra J, Gould E, Vardaman C, Vuitch F. The macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma: a study of 17 cases. *Hum Pathol* 1991;22:1195-1205

[20] Albores-Saavedra J, Housini I, Vuitch F, Snyder WH 3rd. Macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma with minor insular component. *Cancer* 1997;80:1110-1116

[21] Fadda G, Fiorino MC, Mule A, LiVolsi VA. Macrofollicular encapsulated variant of papillary thyroid carcinoma as a potential pitfall in histologic and cytologic diagnosis. A report of three cases. *Acta Cytol* 2002;46:555-559

[22] Sobrinho-Simões M, Nesland JM, Johannessen JV. Columnar-cell carcinoma. Another variant of poorly differentiated carcinoma of the thyroid. *Am J Clin Pathol* 1988;89:264-267

[23] Mizukami Y, Nonomura A, Michigishi T, Noguchi M, Nakamura S, Hashimoto T. Columnar cell carcinoma of the thyroid gland: a case report and review of the literature. *Hum Pathol* 1994;25:1098-1101

[24] Gallagher J, Oertel YC, Oertel JE. Follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid : fine-needle aspirates with histologic correlation. *Diagn Cytopathol* 1997;16:207-213

[25] Hazard JB, Crile GC Jr, Dinsmore RS, Hawk WA, Kenyon R. Neoplasms of the thyroid. Classification, morphology and treatment. *Arch Pathol Lab Med* 1955;59:502-513

[26] Frazell EL, Foote FW Jr. Papillary cancer of the thyroid. A review of 25 years of experience. *Cancer* 1958;11:895-922

[27] Lindsay S. Carcinoma of the Thyroid Gland. A Clinical and Pathologic Study of 293 Patients at the University of California Hospital. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas 1960

[28] Chen KT, Rosai J. Follicular variant of thyroid papillary carcinoma. A clinicopathologic study of six cases. *Am J Surg Pathol* 1977;1:123-130

[29] Meissner WA, Warren S. Tumors of the thyroid gland. In:Atlas of Tumor Pathology. Fascicle 4, 2nd series. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1969

[30] Tischler AS, DeLellis RA. Tumors of thyroid follicular epithelium: where have we been and where are we going? *Endocr Pathol* 2002;13:267-269

[31] Vickery AL Jr. Thyroid papillary carcinoma. Pathological and philosophical controversies. *Am J Surg Pathol* 1983;7:797-807

[32] Chan JK: Papillary carcinoma of thyroid: classical and variants. *Histol Histopathol* 5:241-257, 1990

[33] DeMicco C, Vassko V, Henry JF. The value of thyroid peroxidase immunohistochemistry for preoperative fine-needle aspiration diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid cancer. *Surgery* 1999;126:1200-1204

[34] Baloch ZW, LiVolsi VA. Follicular patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol* 2002;117:143-150

[35] Tscholl-Ducommun J, Hedinger CE. Papillary thyroid carcinomas. Morphology and prognosis. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 1982;396:19-39

[36] Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. Tumors of the thyroid gland: atlas of tumor pathology, 3rd series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1992

[37] Goodell WM, Saboorian MH, Ashfaq R. Fine-needle aspiration diagnosis of the follicular variant of papillary carcinoma. *Cancer* 1998;84:349-354

[38] Evans HL. Follicular neoplasms of the thyroid. A study of 44 cases followed for a minimum of 10 years, with emphasis on differential diagnosis. *Cancer* 1984;54:535-540

[39] Fulciniti F, Benincasa G, Vetrani A, Palombini L. Follicular variant of papillary carcinoma: cytologic findings on FNAB samples – experience with 16 cases. *Diagn Cytopathol* 2001;25:86-93

[40] Baloch ZW, Abraham S, Roberts S, LiVolsi VA. Differential expression of cytokeratins in follicular variant of papillary carcinoma: an immunohistochemical study and its diagnostic utility. *Hum Pathol* 1999;30:1166-1171

[41] Renshaw AA, Gould EW. Why there is the tendency to "overdiagnose" the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002;117:19-21

[42] Williams ED, Abrosimov A, Bogdanova T, Ito M, Rosai J, Sidirov Y, Thomas GA. Guest editorial: two proposals regarding the terminology of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 2000;8:181-183

[43] Rosai J, Zampi G, Carcangiu ML. Papillary carcinoma of the thyroid. A discussion of its several morphologic expressions, with particular emphasis on the follicular variant. *Am J Surg Pathol* 1983;7:809-817

[44] Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 2003;120:71-77

[45] Castro P, Fonseca E, Magalhães J, Sobrinho-Simões M. Follicular, papillary, and "hybrid" carcinomas of the thyroid. *Endocr Pathol* 2002;13:313-320

[46] Baloch ZW, LiVolsi VA. Encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma with bone metastases. *Mod Pathol* 2000;13:861-865

[47] Hapke MR, Dehner LP. The optically clear nucleus: A reliable sign of papillary carcinoma of the thyroid? *Am J Surg Pathol* 1079;3:31-38

[48] Leung CS, Hartwick RW, Bedard YC. Correlation of cytologic and histologic features in variants of papillary carcinoma of the thyroid. *Acta Cytol* 1993;37:645-650

[49] Hugh JC, Duggan MA, Chang-Poon V. The fine-needle aspiration appearance of the follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a report of three cases. *Diagn Cytopathol* 1988;4:196-201

[50] Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-44

[51] Yang GC, Liebeskind D, Messina AV. Should cytopathologists stop reporting follicular neoplasms on fine-needle aspiration of the thyroid? *Cancer* 2003;99:69-74

[52] Harach HR, Zusman SB. Cytologic findings in the follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid. *Acta Cytol* 1992;36:142-146

[53] Das DK, Jain S, Tripathi RP, Parkash S, Khan IU, Rajwanshi A, Gupta S. Marginal vacuoles in thyroid aspirates. *Acta Cytol* 1998;42:1121-1128

[54] Renshaw AA. Focal features of papillary carcinoma of the thyroid in fine-needle aspiration material are strongly associated with papillary carcinoma at resection. *Am J Clin Pathol* 2002;118:208-210

[55] Hernandez-Ortiz MJ, Amengual-Antich I, Canet-Ribas de Pina R. Fine needle aspiration cytology of macrofollicular variant of thyroid papillary carcinoma in a male. *Acta Cytol* 2001;45:483-486

[56] Hirokawa M, Shimizu M, Terayama K, Kanahara T, Sonoo H, Manabe T. Macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma. Report of a case with fine needle aspiration biopsy findings. *Acta Cytol* 1998;42:1441-1443

[57] Woyke S, al-Jassar AK, al-Jazzaf H. Macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma diagnosed by fine needle aspiration biopsy: a case report. *Acta Cytol* 1998; 42:1184-1188

[58] 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: 380-385

[59] Martinez-Parra D, Campos Fernandez J, Hierro-Guilmain CC, Sola Perez J, Perez-Guillermo M. Follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid: to what extent is fine-needle aspiration reliable? *Diagn Cytopathol* 1996;15:12-16

[60] Zacks JF, de las Morenas A, Beazley RM, O'Brien MJ. Fine-needle aspiration cytology diagnosis of colloid nodule versus follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid. *Diagn Cytopathol* 1998;18:97-90

[61] Tabbara SO, Acoury N, Sidawy MK. Multinucleated giant cells in thyroid neoplasms. A cytologic, histologic and immunohistochemical study. *Acta Cytol* 1996;40:1184-1188

[62] Logani S, Osei SY, Li Volsi VA, Baloch ZW. Fine-needle aspiration of follicular variant of papillary carcinoma in a hyperfunctioning thyroid nodule. *Diagn Cytopathol* 2001;25:80-81

[63] Shen PU, Kuhel WI, Yang GC, Hoda SA. Intraoperative touch-imprint cytological diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Diagn Cytopathol* 1997;17: 80-83

[64] Schelfhout LJ, van Muijen GN, Fleuren GJ. Expression of keratin 19 distinguishes papillary thyroid carcinoma from follicular carcinoma and follicular thyroid adenoma. *Am J Clin Pathol* 1989;92: 654-658

[65] Miettinen M, Kovatich AJ, Kärkkäinen P. Keratin subsets in papillary and follicular thyroid lesions. A paraffin section analysis with diagnostic implications. *Virchows Arch* 1997;431:407-413

[66] Sahoo S, Hoda SA, Rosai J, DeLellis RA. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution. *Am J Clin Pathol* 2001;116:696-702

[67] Fonseca E, Nesland JM, Höie J, Sobrinho-Simões M. Pattern of expression of intermediate cytokeratin filaments in the thyroid gland: an immunohistochemical study of simple and stratified epithelial-type cytokeratins. *Virchows Arch* 1997;430:239-245

[68] Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:338-342

[69] Cerilli LA, Mills SE, Rumpel CA, Dudley TH, Moskaluk CA. Interpretation of RET immunostaining in follicular lesions of the thyroid. *Am J Clin Pathol* 2002;118:186-193

[70] Beesley MF, McLaren KM. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology* 2002;41:236-243

[71] Raphael SJ, McKeown-Eyssen G, Asa SL. High-molecular-weight cytokeratin and cytokeratin-19 in the diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 1994;7:295-300

[72] Ritz J, Pesando JM, Notis-McConarty J, Lazarus H, Schlossman SF. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen. *Nature* 1980;283:583-585

[73] Shipp MA, Look T. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993;82:1052-1070

[74] Tomoda C, Kushima R, Takeuti E, Mukaisho K, Hattori T, Kitano H. CD10 expression is useful in the diagnosis of follicular carcinoma and follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2003;13:291-295

[75] Fernandez PL, Merino MJ, Gómez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, Sanjuán X, Cardesa A, Liu FT, Sobel ME. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol* 1997;181:80-86

[76] 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: 2637-2641

[77] Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orlandi F, Nardi F, Vecchione A, Tecce R, Larsson O, and the Thyroid Cancer Study Group. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001;357:1644-1650

[78] Herrmann ME, Li Volsi VA, Pasha TL, Roberts SA, Wojcik EM, Baloch ZW. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:710-713

[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;147:815-822

[80] Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, De Giuli P, Angeli A. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:3015-3020

[81] Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, Okamoto S, Sawada T, Raz A, Kubo T. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999;85:2475-2484

[82] Miettinen M, Kärkkäinen P. Differential reactivity of HBME-1 and CD15 antibodies in benign and malignant thyroid tumours. Preferential reactivity with malignant tumours. *Virchows Arch* 1996;429:213-219

[83] 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;10:668-674

[84] van Hoeven KH, Kovatich AJ, Miettinen M. Immunocytochemical evaluation of HBME-1, CA 19-9, and CD-15 (Leu-M1) in fine-needle aspirates of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 1998;18:93-97

[85] Rigau V, Martel B, Evrard C, Rousselot P, Galateau-Salle F. Interet de l'HBME-1 en pathologie thyroidienne. *Annales Pathologie* 2001;21:15-20

[86] McLaren KM, Cossar DW. The immunohistochemical localization of S100 in the diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. *Hum Pathol* 1996;27:633-636

[87] Manetto V, Lorenzini R, Cordon-Cardo C, Krajewski S, Rosai J, Reed JC, Eusebi V. Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumours. An immunohistochemical and western blot analysis. *Virchows Arch* 1997;430:125-130

[88] Khan A, Baker SP, Patwardhan NA, Pullman JM. CD57 (Leu-7) expression is helpful in diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Virchows Arch* 1998;432:427-432

[89] Wang S, Wuu J, Savas L, Patwardan N, Khan A. The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum Pathol* 1998;29:1304-1309

[90] Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O. Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 11:735-739, 1998

[91] Troncone G, Fulciniti F, Zeppa P, Vetrani A, Caleo A, Palombini L. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 expression in thyroid cells obtained by fine-needle aspiration biopsy: a preliminary report. *Diagn Cytopathol* 2000;23:77-81

[92] Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, Zelterman D, Viale G, Bosari S, Carcangiu ML. Downregulation of p27KIP1 and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol* 1999;23:678-685

[93] Bohm JP, Niskanen LK, Pirinen RT, Kiraly K, Kellokoski JK, Moisio KI, Eskelinen MJ, Tulla HE, Hollmen S, Alhava EM, Kosma VM. Reduced CD44 standard expression is associated with tumour recurrence and unfavourable outcome in differentiated thyroid carcinoma. *J Pathol* 2000;192:321-327

[94] Baloch ZW, Pasha T, LiVolsi VA. Cytoplasmic accumulation of alpha-catenin in thyroid neoplasms. *Head Neck* 2001;23:573-578

[95] Fonseca E, Castanhas S, Sobrinho-Simões M. Expression of simple mucin type antigens and Lewis type 1 and type 2 chain antigens in the thyroid gland: an immunohistochemical study of normal thyroid tissues, benign lesions and malignant tumors. *Endocr Pathol* 1996;7:291-301

[96] Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R. Contribution of carbohydrate antigen sialyl Lewis a and sialyl Lewis x to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res* 1993;53:354-361

[97] Bryne M, Dabelsteen E, Nesland JM. Type 2 chain glycosylation in thyroid carcinomas. *Glycosyl Dis* 1994;1:119-125

[98] Fonseca E, Sobrinho-Simões M. expression of Lewis antigens in papillary carcinoma of the thyroid. *Virchows Arch* 1998;432:483

[99] Ippolito A, Vella V, La Rosa GL, Pellegriti G, Vigneri R, Belfiore A. Immunostaining for MET/HGF receptor may be useful to identify malignancies in thyroid lesions classified suspicious at fine-needle aspiration biopsy. *Thyroid* 2001;11:783-787

[100] Anwar F, Emond MJ, Schmidt RA, Hwang HC, Bronner MP. Retinoblastoma expression in thyroid neoplasms. *Mod Pathol* 2000;13:562-569

[101] Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX-8/PPARγ1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma (corrected). *Science* 2000;289:1357-1360

[102] Mai KT, Ford JC, Yazdi HM, Perkins DG, Commons AS. Immunohistochemical study of papillary thyroid carcinoma and possible papillary thyroid carcinoma-related benign thyroid nodules. *Pathol Res Pract* 2000;196: 533-540

[103] Tallini G. Molecular pathobiology of thyroid neoplasms. *Endocr Pathol* 2002;13:271-288

[104] 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 carcinoma in children. *Cancer Res* 1997;57:1690-1694

[105] Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, Williams ED, Nerovnya A, Cherstvoy ED, Tronko ND, Bogdanova T, Chiapetta G, Viglietto G, Pentimalli F, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Vecchio G. High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4232-4238

[106] Santoro M, Thomas GA, Vecchio G, Williams GH, Fusco A, Chiapetta G, Pozcharskaya V, Bogdanova T, Demidchik EP, Cherstvoy ED, Voscoboinik L, Tronko ND, Carss A, Bunnell H, Tonnachera M, Parma J, Dumont JE, Keller G, Hofler H, Williams ED. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers. *Br J Cancer* 2000;82:315-322

[107] Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, Hayashi T, Mizuno T, Tsuyama N, Dohi K, Nakamura N, Akiyama M. In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res* 1993;53:2940-2943

[108] Basolo F, Giannini R, Monaco C, Melillo RM, Carlomagno F, Pancrazi M, Salvatore G, Chiappetta G, Pacini F, Elisei R, Miccoli P, Pinchera A, Fusco A, Santoro M. Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:247-254

[109] Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simões M. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 1998;185:71-78

[110] Mechler C, Bounacer A, Suarez H, Saint Frison M, Magois C, Aillet G, Gaulier A. Papillary thyroid carcinoma: 6 cases from 2 families with associated lymphocytic thyroiditis harbouring RET/PTC rearrangements. *Br J Cancer* 2001;85:1831-1837

[111] Fusco A. et al.: Assessment of RET/PTC oncogene activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma: a search for the early precursors of papillary cancer. *Am J Pathol* 160:2157-2167, 2002

[112] Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collins P, Pilotti S, Pierotti MA. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinico-pathological features. *Clin Cancer Res* 4:223-228, 1998

[113] Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi, VA, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15044-15049, 2001

[114] Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Máximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simões M. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22:4578-4580

[115] Trovisco V, Castro IV, Soares P, Máximo V, Silva P, Magalhães J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simões M. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004;202:247-251

[116] Garcia Rostan G, Camp RL, Herrero A, Caracangiu ML, Rimm DL, Tallini G. β-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression and ctnnb1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 2001;158:987-996

[117] Ringel MD, Anderson J, Souza SL, Burch HB, Tambascia M, Shriver CD, Tuttle RM. Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. Mod Pathol 2001;14:289-296

[118] Giordano T, Thomas D, Sanders D, Lizyness M, Kuick R, Misek D, Hanash S. Comprehensive gene expression profiles of papillary thyroid carcinoma. *Lab Invest* 2002;82:115A

[119] Perissel B, Coupier I, De Latour M, Cardot N, Penault-Llorca F, Jaffray J, Giollant M, Fonck Y, Malet P. Structural and numerical aberrations of chromosome 22 in a case of follicular variant of papillary thyroid carcinoma revealed by conventional and molecular cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121:33-37

[120] Roque L, Nunes VM, Ribeiro C, Martins C, Soares J. Karyotypic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Cancer* 2001;92:2529-2538

[121] Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. J Clin Endocrinol Metab 83:4116-4122, 1998

RESUMO

O carcinoma papilar é o tumor maligno mais frequente da tireóide e, também, do sistema endócrino. A variante folicular do carcinoma papilar (VFCP) é a variante mais frequente do carcinoma papilar (CP) da tireóide. Após tireoidectomia a VFCP tem, de uma maneira geral, um bom prognóstico, tal como acontece com os CP em geral. Os parâmetros com mais influência no seu prognóstico são: a idade do doente, a presença de metástases à distância, a presença de extensão extra-tireoideia e a dimensão da lesão.

O diagnóstico correcto da VFCP é um dos problemas mais frequentes e mais difíceis em patologia da tireóide e, também, de toda a patologia cirúrgica. Isto deve-se ao facto de este tumor partilhar características do CP – os núcleos – e do adenoma e carcinoma folicular – a arquitectura folicular. Além disso, as características nucleares de CP podem não ser suficientemente vincadas ou não estar presentes difusamente no tumor, mas antes em uma ou várias áreas de dimensões variáveis.

Numa tentativa de melhorar a capacidade de distinguir a VFCP de outras lesões da tireóide – benignas e/ou malignas – foram aplicadas, ao longo do tempo, técnicas complementares moleculares de diagnóstico, tais como a imunohistoquímica. Foram, assim, usados variadíssimos anticorpos que reagem com antigénios que parecem estar mais associados a lesões neoplásicas. O objectivo seria, então, encontrar "marcadores" específicos de malignidade e, mais especificamente, de VFCP. Existem dados na literatura científica que mostram serem alguns anticorpos mais promissores do que outros. Entre estes contam-se o sialyl Lewis x, o CD10, a galectina-3, o HBME-1 e a citoqueratina 19.

Avaliámos a expressão destes cinco marcadores numa série de 57 casos de VFCP arquivados no Registo Oncológico do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, o que correspondeu a todos os casos diagnosticados no Serviço entre Junho de 1998 e Junho de 2002. Foram, também, revistos os parâmetros clínico-patológicos e as características morfológicas dos cinquenta e sete tumores. O estudo imunohistoquímico foi efectuado em cinquenta e três casos. Realizámos um estudo semi-quantitativo da marcação imunohistoquímica "para" os cinco anticorpos acima referidos.

Obtivemos os seguintes resultados:
Sialyl Lewis x – 29/53 casos negativos; os restantes casos tiveram marcação variável, predominantemente focal.
CD10 – 48/53 casos negativos; os restantes casos tiveram marcação variável, predominantemente focal.
Galectina-3 – 26/53 casos negativos; os restantes casos tiveram marcação variável.
HBME-1 – 42/53 caso positivos, com marcação variável, predominatemente multifocal a difusa. Os restantes 11 casos foram negativos.
Citoqueratina 19 – 48/52 casos positivos, com marcação predominantemente difusa. Os restantes 4 casos foram negativos.

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que o estudo imunohistoquímico com anticorpos para o HBME-1 e a citoqueratina 19 podem auxiliar no diagnóstico de VFCP.

SUMMARY

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common malignancy of the thyroid gland. It is also the most frequent endocrine malignancy. The follicular variant of papillary carcinoma (FVPC) is the most frequent variant of PTC. FVPC is usually treated with thyroidectomy and has, in most cases, a good prognosis as do other PTC. Its most important prognostic factors are: the age of the patient, the presence of distant metastases, the presence of extra-thyroid extension and the size of the tumour.

The diagnosis of FVPC is one of the commonest and most difficult problems in thyroid pathology and even in surgical pathology in general. This is due to the fact that this tumour shares features of PTC - namely the nuclei - and also of follicular adenoma and carcinoma – the architecture. Moreover the nuclear features of PTC may not be sufficiently clear and/or they may be present in only one or several small areas of the tumour, rather than diffusely.

Numerous auxiliary diagnostic techniques have been used over time, in order to improve the capacity of the pathologist in distinguishing FVPC from other thyroid lesions, both benign and malignant. Immunohistochemical techniques deserved special attention: numerous antibodies were tested that reacted with antigens more frequently associated with malignant tumours. The purpose would be to find specific "markers" of malignancy, namely FVPC. Data on record in the scientific literature point towards better results with some antibodies than others. Among the most promising antibodies are sialyl Lewis x, CD10, galectin-3, HBME-1 and cytokeratin 19.

We evaluated the expression of these five markers in a series of 57 cases of FVPC that were filed in the Oncology Registry of the Pathology Department of the Hospital de São João, Porto, Portugal. These were all the cases diagnosed in our Service between June 1998 and June 2002. We also reviewed the clinicopathologic parameters and the morphologic characteristics of all 57 cases. The immunohistochemical study was performed in 53 cases and we performed a semi-quantitative study of the immunohistochemical expression of the five antibodies mentioned above.

The results were as follows:
Sialyl Lewis x – 29/53 cases were negative. The remaining cases stained variably, with predominantly focal staining.
CD10 – 48/53 cases were negative. The remaining cases stained variably, with predominantly focal staining.
Galectin-3 – 26/53 cases were negative. The remaining cases stained variably.
HBME-1 – 42/53 cases were positive, the staining was variable, predominantly multifocal to diffuse. The remaining 11 cases were negative.
Cytokeratin 19 – 48/52 cases were positive, the staining was predominantly diffuse. The remaining 4 cases were negative.

In conclusion: our results suggest that the immunohistochemical study with antibodies for HBME-1 and cytokeratin 19 are helpful in the diagnosis of FVPC.


FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO
1825

UNIVERSITAS PORTUCALENSIS