

ROSANA LEITE DE MELO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE TIROSINA
QUINASE- RON EM CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE**

CAMPO GRANDE
2010

ROSANA LEITE DE MELO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE TIROSINA
QUINASE- RON EM CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-oeste
da Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr Ricardo Dutra Aydos
Co-orientador: Alexandre N. Odashiro

CAMPO GRANDE
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROSANA LEITE DE MELO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE TIROSINA QUINASE – RON
EM CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-oeste
da Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____ .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos – Presidente
Universidade Federal de Mato grosso do Sul – UFMS

Prof. Dr. José Magrin – Membro
AC Camargo

Prof. Dr. João Ricardo F. Tognini – Membro
Universidade Federal de Mato grosso do Sul – UFMS

Prof. Dra. Iandara Schettert Silva – Membro Suplente
Universidade Federal de Mato grosso do Sul – UFMS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes portadores de câncer, não somente o câncer da tireóide, mas também as outras neoplasias malignas, que possam ter acesso aos melhores tratamentos e, acima de tudo, esperanças em suas vidas.

Dedico ao meu **sobrinho Fernando** pelo fato dele ter trazido alegria e esperança a toda a nossa família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, a toda essa energia superior da criação, pela dádiva da vida, por minha saúde e pela possibilidade de aquisição de conhecimento e crescimentos constantes.

Agradeço ao meu orientador, **Dr Ricardo Dutra Aydos**, pela paciência e compreensão, imprescindíveis à conclusão deste estudo.

Agradeço ao **Dr Alexandre Nakao Odashiro** que gentilmente foi um dos patologistas que analisou as lâminas histológicas e também de forma muito didática me orientou quanto à metodologia deste estudo.

Agradeço à **Dra Luciana Odashiro Mijji** que interrompeu seus trabalhos e também realizou a análise das lâminas histo- patológicas. Também a agradeço por sua sincera e verdadeira amizade.

Agradeço aos meus pais, **Severino e Abadia**, que na simplicidade com a qual me educaram sempre me estimularam a aquisição de conhecimentos. Agradeço pelo exemplo de honestidade, dignidade e respeito, bem como o amor e cuidados a mim dispensados por todos esses anos.

Agradeço a minhas irmãs, **Tânia e Kele**, meu irmão **Wilson** e minha cunhada **Brenda**, pelo exemplo diário, por fazerem parte do grupo de pessoas que sempre estão torcendo pelo nosso melhor, mesmo quando esse melhor fica bem aquém do esperado e pela compreensão das minhas ausências durante a realização deste trabalho.

Agradeço a **todos os pacientes** que participaram deste estudo, permitindo a utilização de seus materiais biológicos (blocos de parafina), pois sem essas pessoas meu trabalho jamais seria realizado.

Agradeço aos **meus pacientes** que a cada dia me proporcionam não só satisfação profissional, mas também aprendizagem e crescimento com suas histórias, angústias e respeito a mim dedicado.

Agradeço a **Sta. Inês** que gentilmente me auxiliou na realização estatística deste trabalho. Agradeço aos alunos do Doutorado **Dr Wilson Cantero e Rondon Tosta** que através de suas críticas e correções proporcionaram uma melhor apresentação desta dissertação.

Agradeço ao **Jonathan**, pela paciência e o carinho ao me ensinar a estatística que utilizamos, bem como toda a técnica de formatação deste trabalho. Ajuda imprescindível para a finalização deste trabalho.

Agradeço a disponibilidade do **Dr João Ricardo Tognini**, do **Dr José Magrin** e da **Dra. Iandara Silva** que são pessoas extremamente atarefadas e mesmo assim aceitaram gentilmente participarem da Banca examinadora.

RESUMO

Melo, RL. Avaliação da hiperexpressão do receptor da tirosina quinase- RON em carcinoma papilífero de tireóide. Campo Grande; 2010. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Expressões alteradas dos receptores da tirosina quinase têm sido observadas em amostras de câncer, estando relacionadas com vários comportamentos malignos. Alterações do receptor da tirosina quinase-RON possuem um papel na regulação do comportamento maligno do câncer de tireóide. O objetivo deste estudo foi avaliar a hiperexpressão do marcador RON em amostras de carcinoma papilífero da tireóide, correlacionando-a com achados clínico-patológicos. Dezenove amostras foram estudadas, onde houve a hiperexpressão em 31% dos casos, sendo que 100% apresentaram expressão. Hiperexpressão apresentou correlação com o comprometimento capsular ($p=0,003$) e com a extensão extra tireoidiana ($p=0,017$). Esses achados corroboram que a hiperexpressão do RON ocorre em tumores com comportamento mais agressivos. Maiores conhecimentos do comportamento do RON em câncer de tireóide poderão ser importantes à utilização de drogas de terapias alvos contra o câncer de tireóide.

Palavras-chave: câncer de tireóide, hiperexpressão, RON

ABSTRACT

Melo,RL. Evaluation of overexpression of the receptor tyrosine kinase RON in papillary thyroid carcinoma. Campo Grande; 2010. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Altered expressions of receptor tyrosine kinase have been observed in cancer samples, being related to several malignant behavior. Changes of receptor tyrosine kinase RON have a role in regulating the malignant behavior of thyroid cancer. The aim of this study was to evaluate the marker RON overexpression in samples of papillary thyroid carcinoma, its correlation with clinicopathological features. Nineteen samples were studied, where there was a overexpression in 31% of cases, while 100% showed expression. Overexpression correlated with capsular involvement ($p=0.003$) and with the extra-thyroid extension ($p=0.017$). These findings confirm that the overexpression of RON occurs in tumors with more aggressive behavior. Greater knowledge of the behavior of RON in thyroid cancer may be important to use drug therapy targets thyroid cancer.

Keywords: thyroid cancer, overexpression, RON

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa das variáveis de identificação observadas. Campo Grande, 2010	45
Tabela 2 – Tipo de cirurgia e peso glandular: medidas e frequências absoluta e relativa. Campo Grande - 2010	46
Tabela 3 – Frequência absoluta e relativa de acordo com as características anatomopatológicas dos tumores avaliados Campo Grande – 2010	47
Tabela 4 – Correlação da expressão do marcador RON com achados anatomopatológicos. Campo Grande – 2010	50
Tabela 5 – Correlação da expressão do marcador RON com o T (tumor). Campo Grande – 2010.....	51
Tabela 6 – Correlação da expressão do marcador RON com estadiamento clínico. Campo Grande – 2010	52
Tabela 7 – Frequência absoluta e relativa da intensidade da expressão e porcentagem de células coradas. Campo grande – 2010	52
Tabela 8 – Correlação da intensidade da expressão do marcador RON com porcentagem de células coradas. Campo grande – 2010	52
Tabela 9 – Correlação da porcentagem de células coradas com a idade, gênero e a etnia. Campo grande – 2010	53
Tabela 10- Distribuição da casuística de acordo com a porcentagem de células coradas. Campo grande – 2010	54

Tabela 11 – Correlação da porcentagem de células coradas com achados anatomo- patológicos. Campo Grande – 2010	54
Tabela 12 – Análise da Pesquisa de Corpo Inteiro e iodoterapia. Campo Grande – 2010.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura ilustrando o papel da cascata MAP-quinase pelo receptor da tirosina-quinase ativado.....	25
Figura 2 – Figura ilustrando as formas mutadas de receptores tirosina-quinase como produto de oncogene.....	33
Figura 3 – Gráfico ilustrando a frequência relativa da multifocalidade	46
Figura 4 – Gráfico ilustrando a distribuição dos casos conforme o estadiamento clínico- patológico. UICC, 6ª. edição	48
Figura 5 – Fotomicrografia da expressão de RON nas amostras tumorais.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácidos
Ac	Anticorpos
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BRAF	Proto oncogene Serina-treonina-proteína quinase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
c-DNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
c-MET	met proto-oncogene (Receptor do Fator de Crescimento de Hepatócito)
CoTr	Cólon Transfectadas
c-Src	Forma abreviada de sarcoma
FAK	Proteína Quinase de Adesão Focal
EMT	Epithelial Mesenchymal Tissue
HCT	Human cell colon epitheliun
HE	Hematoxilina eosina
HCl	Ácido clorídrico
HGF	Fator de crescimento de Hepatócito
INCA	Instituto Nacional do Câncer do Brasil
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
pH	Potencial hidrogeniônico
M	Metástase
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MARK	Proteína quinase ras-mitogênica-ativada
MDCK	Medin Darby Canine Kidney
MET	Proteína cinase mitogênica.
MSP	Proteína Estimuladora de Macrófago
N	Linfonodo
NCI	Instituto Norte Americano do Câncer
NHU	Núcleo do Hospital Universitário
NSCLL	Carcinoma de pulmão não pequenas células
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCI	Pesquisa de Corpo Inteiro
PI-3K	Quinase fosfotidol-inositol-3
RAS	RAt Sarcoma.
RET	Reorganizados durante transfecção
RNA-m	Ácido ribonucléico mensageiro
RON	Receptor de origem nantais.
RTKs	Receptores da tirosina quinases (cinases).
RT-PCR	Reação em cadeia da Transcriptase Polimerase Reversa.
Stk	Proteína Serinea/treonina cinase
T	Tumor
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina ou Tiroxina
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UICC	União Internacional Contra o Câncer

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	quilo-dawton
±	mais ou menos
+	cruz
=	igual
μc	micrograma
mCi	milicuries
mM	milimol
mm	milímetro
n	frequência
%	porcentagem
p	probabilidade de erro alfa
X ²	chi quadrado
H	Hidrogênio
Cl	Cloro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Câncer tireoidiano	18
2.1.1 <u>Alterações genéticas no câncer tireoidiano</u>	22
2.2 RON – Receptor	26
2.2.1 <u>Função biológica de RON</u>	28
2.2.1.1 Adesão	29
2.2.1.2 Invasão e motilidade	30
2.2.1.3 Mediação de RON na EMT	30
2.2.1.4 RON – Inibição da apoptose	31
2.2.1.5 RON – Oncogene	32
2.2.1.6 RON – Mediador de metástases	33
2.2.2 <u>Expressão do RON no câncer</u>	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODO	38
4.1 Amostra	38
4.2 Dados do prontuário	38
4.3 Análise histológica (amostras tumorais)	39
4.3.1 <u>Preparo de blocos e lâminas</u>	39
4.3.2 <u>Análise histológica</u>	39
4.3.3 <u>Imunoistoquímica</u>	40
4.3.4 <u>Classificação da expressão</u>	41
4.3.5 <u>Captura de imagem da microscopia</u>	42
4.4 Análise estatística	43
4.5 Normas adotadas	43
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	60

REFERÊNCIAS.....	61
GLOSSÁRIO	73
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	75
APÊNDICE B – Formulário de Coleta de Dados	77
ANEXO A – Estadiamento Clínico	78

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireóide é o tipo mais prevalente de neoplasia endócrina, com taxas de incidências de 4 e 12 por 100.000 homens e mulheres respectivamente ⁴.

Nos últimos anos, o câncer de tireóide, juntamente com o melanoma maligno, é o tipo de câncer que mais vem crescendo no Brasil, com aproximadamente 18 mil casos previstos para 2010 ⁷.

O carcinoma papilífero e o carcinoma folicular são as neoplasias epiteliais derivadas das células foliculares¹⁻⁷⁻¹⁹ e em conjunto recebem o nome de carcinomas bem diferenciados da tireóide por razões clínicas e morfológicas que justificam agregá-los. ¹⁻⁷⁻¹¹ Eles correspondem à maioria dos tumores primários da tireóide ⁴⁻⁷

A incidência do carcinoma papilífero varia de 80 a 85%⁴⁻⁷. Alterações genéticas de alguns oncogenes estão relacionadas à carcinogênese tireoidiana, sendo a mutação RET/PTC uma das mais estudadas¹³⁻¹⁹⁻²⁸

A elucidação das vias de sinalização que iniciam ou conduzem a transformação neoplásica são essenciais para determinar não somente o comportamento de determinado tumor, mas também útil na descoberta de novas drogas que agindo em alguma etapa da carcinogênese possa interromper esse processo ou até mesmo revertê-lo.

Os receptores da tirosina quinase estão envolvidos em inúmeras etapas da carcinogênese, notadamente dos tumores epiteliais. O RON - receptor da tirosina quinase - tem sido estudado em diversas amostras de cânceres epiteliais e evidências sugerem uma importância deste receptor na determinação fenotípica durante a carcinogênese. Ele encontra-se associado a várias etapas da carcinogênese e também relacionado com a progressão tumoral.

Atualmente existem estudos³⁷⁻⁴²⁻⁴³⁻⁴⁴⁻⁵⁰⁻⁶⁵ avaliando a expressão de RON em diversas amostras tumorais, como em câncer de mama, câncer colônico e câncer de ovário. Alguns mostraram correlação com a agressividade tumoral e outros tal relação não se evidenciou.

No câncer de tireóide, os estudos demonstraram que há uma expressão tumoral deste receptor em amostras neoplásicas⁵⁰⁻⁶⁵, sendo que a hiperexpressão do RON foi correlacionada com maior agressividade tumoral e comprometimento metastático linfonodal⁶⁵. Em relação à correlação da hiperexpressão de RON com

critérios clínicos e características tumorais os trabalhos são infreqüentes, daí o interesse do presente estudo.

O presente trabalho pretende avaliar a expressão de RON em amostras de carcinoma papilífero de tireóide e correlacioná-la com os achados anatomopatológicos e o estadiamento clínico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer tireoidiano

A tireóide é uma estrutura ímpar e mediana, profundamente situada na região infra-hioidea da face anterior do pescoço na altura da quinta a sétima vértebras cervicais, e está recoberta pela lâmina pré-traqueal da fascia cervical profunda, que a fixa à laringe e à traquéia. Apresenta origem embriológica do assoalho da faringe e possui peso de 20 a 30g¹. Possui um formato semelhante ao “H”, sendo formada por dois lobos laterais que se unem na linha média por um delgado istmo.

É uma glândula pertencente ao sistema endócrino humano. Possui a capacidade de segregar substâncias, ditas hormônios, diretamente na corrente sanguínea, os quais desempenharão papel importante na homeostase do corpo humano.

Histologicamente, a tireóide é envolvida por uma fina cápsula de tecido conjuntivo que envia septos ao interior da glândula. É constituída por dois tipos de células epiteliais, com funções diferentes: as células foliculares e as parafoliculares. Ela exibe uma estrutura altamente organizada, sendo o folículo tireóideo a unidade funcional da glândula e responsável pela secreção dos hormônios tireóideos².

Os hormônios produzidos pelas glândulas tireoidianas são a Tiroxina (T4) e a Triiodotironina (T3) que têm efeitos moduladores importantes durante o processo de diferenciação, maturação e crescimento do organismo³. Tais hormônios são ainda essenciais para o metabolismo celular e à produção de energia³. A função normal da tireóide é determinada pela regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, bem como por fatores locais, principalmente o conteúdo de iodo glandular^{2,3}.

As patologias que acometem a glândula tireóide classicamente estão divididas em alterações funcionais e estruturais. As alterações funcionais estão representadas por aquelas onde há uma alteração glandular decorrente de distúrbios hormonais, inflamatórios ou infecciosos, o que resulta em aumento ou diminuição da produção de hormônios pela glândula. No que tange às alterações

estruturais temos desde anomalias congênitas, como as do ducto tireoglosso, até as neoplasias benignas, como os bócios e as neoplasias malignas como os cânceres tireoidianos¹.

O câncer primário da tireóide constitui uma neoplasia maligna relativamente rara, representando cerca de 1% de todas as neoplasias humanas. É o tipo mais prevalente de neoplasia endócrina, com taxas de incidências de 4 e 12 por 100.000 em homens e mulheres respectivamente⁴.

Nos Estados Unidos são relatados aproximadamente 18 mil casos novos a cada ano⁵. Dados do Instituto Norte Americano do Câncer (NCI) prevêem 44.670 casos novos e 1.690 mortes para o ano de 2010⁶. Estudos realizados pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer do Brasil) e comprovados pelos vários Registros Populacionais de Câncer do país, apontam um aumento na incidência do câncer no Brasil, sendo que o câncer da tireóide está na lista dos que mais cresceram nos últimos anos. No Brasil, segundo dados do INCA, são previstos 18 mil casos novos para 2010⁷.

O câncer da tireóide apresenta uma variação geográfica na sua incidência, enquanto que, em alguns países não ultrapassa 1% de todas as neoplasias, em outras regiões, como o Oriente Médio, é a segunda neoplasia mais comum em mulheres⁸. No Brasil, os arquivos mostram uma grande variabilidade da sua incidência nas diferentes regiões⁹. Esta grande variação de incidência reflete não só o acesso aos serviços de saúde e a possibilidade de se empregar diversos métodos diagnósticos, mas também alterações ambientais e genéticas das populações estudadas¹⁰.

A média de idade ao diagnóstico do câncer tireoidiano é de 45 a 50 anos, sendo as mulheres 2 a 4 vezes mais acometidas que os homens¹⁰⁻¹¹. Em crianças e adolescentes, o carcinoma da tireóide é o terceiro tumor sólido em ordem de frequência; nesta faixa etária mais jovem, o tumor apresenta um comportamento mais metastatizante do que nos adultos, sendo que, 60- 80% deles apresentam metástases para linfonodos ao diagnóstico. Além do mais, a recorrência local e à distância é alta (10-35%). Apesar deste comportamento mais agressivo o prognóstico é bom com uma taxa de sobrevivência de 20 anos superior a 95%¹²⁻¹³.

Os carcinomas da tireóide classificam-se de acordo com os achados histológicos em: carcinoma papilífero, folicular, anaplásico ou indiferenciado, carcinoma medular e os linfomas primários da tireóide. Em raros casos a tireóide

pode ser acometida por metástases de tumores originários de outros órgãos, principalmente oriundas do pulmão, rim, mama, trato gastrointestinal e do sistema hematopoiético¹³.

Embora o tipo celular seja um determinante importante ao prognóstico do câncer tireoidiano, para o manejo clínico ele é dividido em carcinomas bem diferenciado e pouco diferenciado⁶.

Os carcinomas bem diferenciados da tireóide classificam-se de acordo com os achado histológicos pela Organização Mundial de Saúde - OMS em carcinomas papilíferos (clássicos e variantes) e folicular (minimamente invasivo e invasivo)¹³⁻¹⁹.

Assim considerado, o carcinoma bem diferenciado da tireóide, é a segunda neoplasia mais comum da região de cabeça e pescoço e a primeira do sistema endócrino. Ocorre em 5 a 10% dos portadores de nódulo tireoidiano único e é responsável por 90% dos carcinomas primários da glândula tireóide¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁹. Entre os subtipos dos carcinomas bem diferenciados, o carcinoma papilífero compreende 80-85% dos casos. Cerca de 10 a 15% são carcinomas foliculares e 3 a 5% carcinomas de células de Hurthle¹⁵⁻²¹. Em análises de necrópsias consecutivas foram encontrado 3 a 36% de carcinoma papilífero²⁰⁻²¹.

Apesar de inúmeras pesquisas realizadas a etiologia exata do câncer tireoidiano permanece indeterminada, sendo a irradiação ionizante da região de cabeça e pescoço o único fator causal bem reconhecido¹⁹⁻²¹.

A nova classificação da OMS respeita bastante as classificações clássicas anteriormente publicadas. Entretanto, os avanços de biologia molecular permitem que algumas afirmações se mantenham e que outras características necessitem de maiores esclarecimentos nos próximos anos¹⁴⁻¹⁶. Por conseguinte, ela corrobora a separação tradicional nos quatro grupos anteriormente citados¹⁴.

Os genes envolvidos na patogênese desses quatro grupos são distintos, com muito pouca sobreposição entre eles, confirmando suas diferenças morfológicas¹⁵. Entretanto, entidades como o carcinoma papilífero variante folicular, apresentam aspectos moleculares tanto do carcinoma papilífero como do folicular.

O carcinoma bem diferenciado de tireóide geralmente se apresenta clinicamente como um nódulo único e assintomático, porém o primeiro sinal da doença pode ser ocasionalmente a presença de metástases em linfonodos ou mais raramente nos pulmões e nos ossos¹³⁻¹⁷⁻¹⁹.

Ao exame físico o carcinoma da tireóide apresenta-se como um nódulo firme, móvel à deglutição, e indistinguível de um nódulo benigno. Dessa forma, associada à história clínica detalhada faz-se necessária efetuação da investigação diagnóstica subsequente.

A Punção Aspirativa por Agulha Fina (P A A F), guiada por ultra-som mostrou um impacto importante ao diagnóstico do câncer tireoidiano. Estudos mostram que houve uma diminuição no número total de tireoidectomias realizadas com um aumento no diagnóstico de câncer da tireóide¹⁶⁻¹⁷. A acurácia, a sensibilidade e o valor preditivo da Punção Aspirativa por Agulha Fina é superior a 90%¹⁷. No entanto, não é possível assegurar a real natureza do nódulo quando a amostra do material é escassa ou se o material aspirado exibir apenas o padrão folicular tireóideo. O laudo citológico limitado ao “padrão folicular” ocorre em 15 a 22% dos exames¹⁷⁻²²⁻⁷⁹.

O carcinoma papilífero ao disseminar-se, apresenta tendência ao desenvolvimento de metástases linfático cervical, enquanto que o carcinoma folicular apresenta mais metástases hematogênicas¹⁵⁻¹⁹⁻⁸⁰. Na literatura vigente, ao se considerar a incidência de metástases ela varia de 16 a 80%.¹⁵⁻¹⁹ Tal disparidade é devida às diferentes condutas adotadas. O número de casos diagnosticados é maior quando realizamos o esvaziamento cervical sistemático e a pesquisa de micrometástases.¹⁵⁻¹⁹⁻⁷⁴⁻⁷⁸.

Em oncologia, o estadiamento clínico é o primeiro passo para o entendimento da extensão e do prognóstico dos tumores malignos, bem como importantíssimo para o tratamento adequado¹⁹. A nova classificação TNM proposta pela União Internacional Contra o Câncer – UICC - em 2002, aplica-se somente aos carcinomas da tireóide, utiliza os dados histopatológicos e exames de imagem (ANEXO A- p. 75).

Em relação aos fatores prognósticos do câncer tireoidiano, desde a década de 70 diversos estudos foram publicados na intenção de se classificar os pacientes de acordo com características individuais e tumorais em escores de níveis de prognósticos¹⁸⁻¹⁹⁻²³⁻⁷⁸.

Vários autores propuseram a classificação dos pacientes em grupos de riscos segundo fatores prognósticos¹⁶⁻¹⁸⁻¹⁹⁻⁷³⁻⁷⁸. Uma das primeiras classificações foi idealizada por Cady e colaboradores⁷⁷ em 1979 e levava em consideração a idade, a

presença de metástases hematogênicas, a extensão extra tireoidiana e o tamanho do tumor.

Em 1998, Shaha e colaboradores⁷⁸ descreveram os pacientes em três grupos de risco, utilizando os fatores prognósticos de Cady.(Anexo B- p.78)

Classicamente, os fatores prognósticos que se mostraram mais significativos são o tamanho tumoral e o estadiamento (tumor intra-tireoidiano, extensão extra-tireoidiana e presença ou ausência de metástases)¹⁹.

Em relação ao tratamento, o mais preconizado é a realização de tireoidectomia total¹⁵⁻¹⁹. Alguns centros preconizam a tireoidectomia parcial aos pacientes de baixo risco¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁹.

Ao nos remetermos ao esvaziamento linfático cervical encontramos controvérsia entre os diversos centros de tratamento, mesmo ao considerar a alta frequência de metástases linfáticas. A escola norte-americana não recomenda o esvaziamento cervical eletivo, alegando que as presenças de metástases linfáticas não alteram a sobrevida dos doentes e que a abordagem cervical aumentaria a incidência de complicações⁷¹⁻⁷²⁻⁷³⁻⁷⁴. As escolas japonesas e européias ao considerarem que em uma segunda operação há um maior risco de complicações do que a primeira, preconizam o esvaziamento cervical sistemático⁷⁴⁻⁷⁵⁻⁷⁶.

A utilização do iodo radioativo (I^{131}) como tratamento adjuvante é indicada em pacientes de alto risco, com multicentricidade tumoral, doença residual, tumor inoperável, metástase linfonodal e à distância e doença recorrente¹⁹.

No carcinoma avançado a realização de quimioterapia convencional e radioterapia adjuvante não apresentam resultados efetivos, dessa forma constitui um dilema terapêutico sendo considerado um grande campo de pesquisa na atualidade, principalmente relacionado à biologia molecular no intuito de descobertas de terapias alvos.

2.1.1 Alterações genéticas no câncer tireoidiano

Como conhecimento corrente, é sabido que o câncer ocorre devido a danos genéticos, adquiridos ou herdados, conferindo uma vantagem a uma célula e tendo como consequência o surgimento de clones de células que escapam aos

controles normais de crescimento e diferenciação²⁰⁻²¹. Esses recentes avanços na genética molecular têm proporcionado melhores entendimentos sobre o surgimento e progressão tumoral.

Fatores genéticos envolvidos nos mecanismos de defesa celular frente a fatores lesivos provenientes tanto de nosso próprio metabolismo como, principalmente, do meio ambiente, e aos quais estamos constantemente expostos, modulam nossa propensão ao câncer de tireóide²¹. A presença de anormalidades tanto nos oncogenes, genes estimuladores de divisão celular, como nos genes supressores, genes protetores ou bloqueadores do ciclo celular, podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais²².

Os genes da telomerase, os genes envolvidos na apoptose e os genes de reparo do DNA intervêm diretamente no processo da carcinogênese.²³⁻²⁴ Entretanto, para que haja a progressão do tumor, vários outros genes devem estar alterados. Sabemos que o processo de metastatização é seletivo para as poucas células que conseguem produzir vasos (angiogênese), mover-se, vencendo barreiras e invadindo as células vizinhas, cápsulas, embolizar e sobreviver ao ataque de células do sistema imunológico na corrente sanguínea, parar em leitos capilares distantes e extravasar e se multiplicarem dentro do parênquima de outros órgãos. Todos esses passos exigem a ativação e desativação de uma série de genes²¹⁻²³.

Através dos avanços da medicina molecular, diversos trabalhos têm demonstrado a importância do conhecimento dos mecanismos genéticos que conduzem à carcinogênese²³⁻²⁴⁻²⁷⁻³². A descoberta de mutações de determinados genes responsáveis, não apenas pelo início da carcinogênese, mas também, responsáveis pelos mecanismos de progressão e metastatização veio motivar o surgimento de mais pesquisas no intuito de se conseguir uma terapia gênica oncológica efetiva²⁴⁻²⁷.

Os principais genes envolvidos na tumorigênese tireoidiana são os genes RAS, RET, BRAF e PAX8-PPAr-y.⁴³ As mutações de RET-PTC, RAS ou BRAF são encontradas em cerca de dois terços dos carcinomas papilíferos sem praticamente nenhuma sobreposição, fornecendo evidente importância fundamental da ativação constitutiva da via sinalizadora RET-RAS-BRAF-MAPK para a etiopatogenia do carcinoma papilífero. Em relação aos oncogenes GSPE rTSH, aproximadamente 10% dos carcinomas bem diferenciados apresentam mutação²³⁻⁴³.

A mutação mais freqüentemente encontrada nos carcinomas papilíferos é a do gene BRAF, pertencente à família da RAF serina- treonina cinase, cuja ativação é desencadeada pela ligação de RAS²⁴⁻⁴³. A mutação consiste em uma transversão de timina para adenina na posição 799 (T799A) do gene, causando a substituição do aminoácido valina por um glutamato na posição 600 da proteína BRAF (V600E). Esta mutação ativa constitutivamente a bRAF cinase²⁴. Uma vez totalmente ativada, a proteína RAF fosforila e ativa MEK que, por sua vez, ativa ERK e os efetores subsequentes da cascata da MAPK. (lustrado na figura 1). A proteína BRAF é a mais ativa entre as proteínas RAF e é a que mais fosforila MEK quando ativada por RAS^{25,26}. Também a superexpressão da mutação de BRAF é capaz de transformar células de camundongos em células com aparência de carcinoma papilífero. As mutações de BRAF ocorrem de modo mutuamente exclusivo em relação às outras mutações mais freqüentes do carcinoma papilífero, as mutações nos genes RAS e RET, todos participantes da mesma via da MAPK²⁷⁻⁴²⁻⁴⁶. Evidências atuais sugerem que o gene BRAF seria necessário para a expressão de uma série de genes regulados por RET-PTC²⁸.

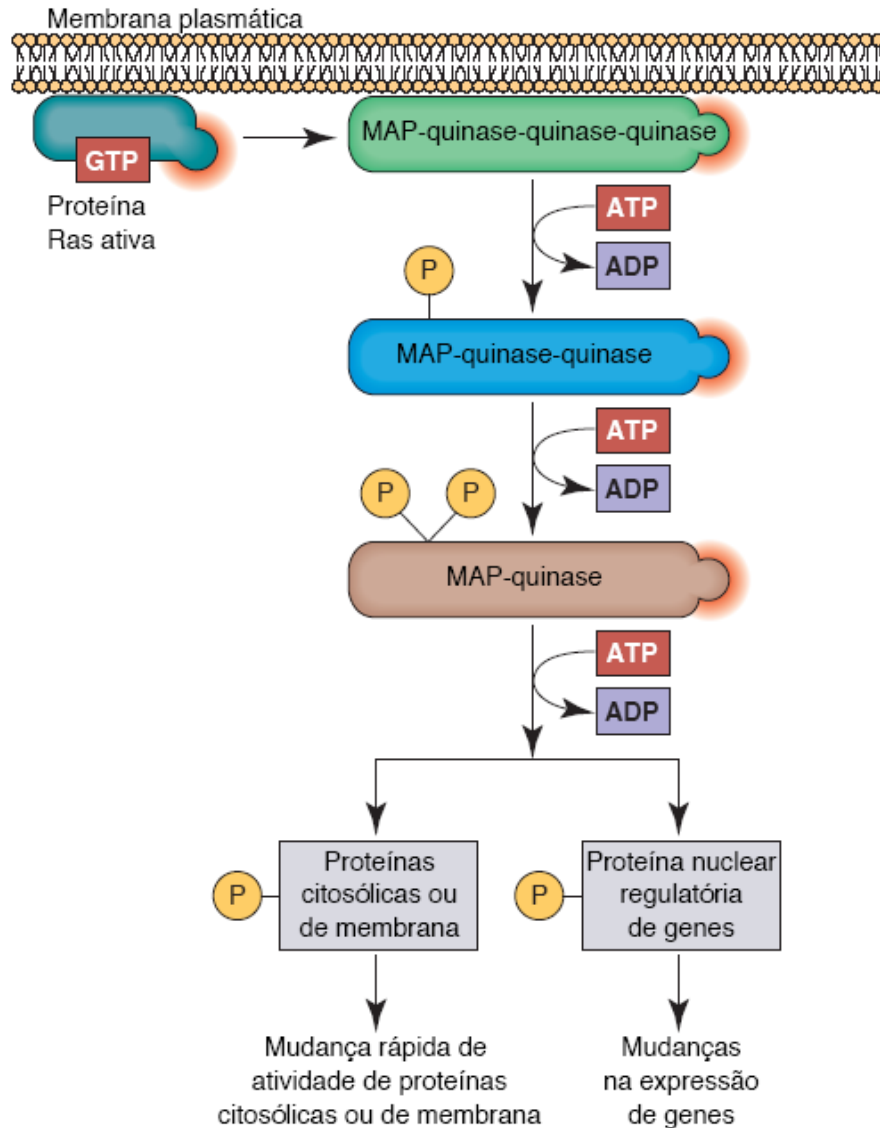


Figura 1 – Papel da cascata de MAP quinase durante transdução de sinal intracelular pelo receptor tirosina quinase ativado. Redesenhado com base em figura de Alberts, B., et al. *Essential Cell Biology*, 2nd ed. New York: Garland, 2004.

A via da tirosina quinase (TRK), também componente da via MAPK, está associada unicamente ao aparecimento do fenótipo papilífero. Os oncogenes RET e TRK são ativados através de rearranjos e ocorrem nos carcinomas papilíferos. Os genes RET, que habitualmente não se encontram expressos em células foliculares normais, encontram-se hiperexpressos em aproximadamente 50% dos carcinomas da tireóide²⁹. RET é ativado por fusão do seu fragmento C terminal contendo o domínio tirosino quinase com três principais porções de outros genes³⁰.

Uma série de publicações sugeriu o envolvimento da via das proteínas quinases (PKC) em tumores foliculares da tireóide²⁹⁻³¹⁻³⁵. A via da PKC está

envolvida no processo de crescimento e diferenciação de várias células, existindo descrição de envolvimento de várias isoformas de enzimas da via PKC em diversos tumores humanos³⁰⁻³¹.

A partir da última década, destacam-se os trabalhos sobre marcadores biológicos dos carcinomas tireoidianos, conduzindo às publicações de relatos de investigação de marcadores moleculares, imunológicos, imunoistoquímicos e genéticos com a intenção de prever qual tipo de pacientes teriam benefícios com tratamentos mais ou menos conservadores³².

Uma série de terapias gênicas está em desenvolvimento, algumas já em fase clínica de experimentação³². Assim o bloqueio da via MAPK poderá ser conseguido por meio de compostos que agem em BRAF, RET, RAS e em outros componentes da via³³⁻³⁴. A utilização do ácido retinóico, que promove a re-diferenciação celular, tem sido utilizada em alguns centros. A talidomida tem demonstrado interessante ação anti-angiogênica¹⁵⁻³².

A evolução do conhecimento científico encontra-se tão acelerada que num futuro não muito distante poderemos detectar oncogenes inadequadamente ativados, reintroduzir genes supressores tumorais perdidos ou defeituosos, induzir células mutadas à apoptose, impedir a proliferação e metastatização à distância, cortando o suprimento sanguíneo tumoral, reativando o conhecimento imunológico de células tumorais; e muitas outras estratégias deverão estar disponíveis¹⁹⁻³⁴.

2.2 RON – Receptor da tirosina-quinase

Recepteur d'origine nantis (RON) é um membro da família MET de proto-oncogenes dos Receptores da Tirosina Quinase (RTKs), juntamente com Stk, c-MET, e c-Sea³⁵. c-MET, o receptor para o Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF; também conhecido como fator de Scatter) está associado com muitos processos relacionados ao desenvolvimento e disseminação tumoral. C-Sea está expresso como receptor de superfície das células de galinhas, enquanto o Stk é um homólogo murino de RON³⁵. c-MET e RON são os únicos membros da família MET que existem em humanos, embora o RON seja mantido evolutivamente em múltiplas espécies; sugerindo uma função vital para este receptor³⁴.

O gene humano de RON foi inicialmente identificado e isolado através da seleção complementar de DNA de preparado do epitélio da pele humana (queratinócitos)³⁶. Este gene foi localizado no cromossoma humano 3p21, o qual se encontra geralmente mutado em carcinoma de pequenas células de pulmão e carcinoma de células renais³⁵. As proteínas ligantes para RON, proteína estimuladora de macrófago (MSP), também se encontram na região 3p21.

RON é uma proteína de 180 kDa formada por um heterodímero de cadeia alfa de 40-kDa e uma cadeia beta de 150 kDa³⁵. RON é inicialmente formado como uma única cadeia precursora, pro-RON, e suas adesões estão nas duas cadeias ativas. A cadeia alfa é completamente extracelular, enquanto que a cadeia beta atravessa a membrana celular e contém a tirosina quinase intracelular e elementos regulatórios³⁵. RON e c-MET são os únicos RTKs a possuírem um domínio na porção extracelular da proteína³⁷⁻³⁸. Este domínio especializado fora conservado do padrão de resíduos de cisteínas, seqüência de aminoácidos e um sítio potencial de glicosilação³⁷⁻³⁸.

A função do RON tem sido mostrada como sendo importante no desenvolvimento embriológico, uma característica comum encontrada em muitos do RTKs envolvidos no processo carcinogênico. A função do RON durante o desenvolvimento foi estabelecida pelo uso de RON homozigoto e heterozigoto de ratos³⁹⁻⁴⁰. A perda de homozigose foi embriologicamente letal no 6,5 dia durante o estágio de peri - implantação do desenvolvimento³⁹. A letalidade da homozigose de RON em ratos em fase inicial do desenvolvimento enfatizou o papel crítico de RON no desenvolvimento embrionário³⁹⁻⁴⁰. Em contraste os ratos heterozigotos desenvolveram-se normalmente até a idade adulta, exceto por apresentarem uma resposta inflamatória inapropriada. A resposta inflamatória inapropriada fora associada a dano na regulação do óxido nítrico⁴⁰.

RON encontra-se expresso em inúmeros tipos de células epiteliais, incluindo benignas e malignas. RON também foi identificado nos macrófagos, células-tronco da medula óssea e osteoclastos⁴¹⁻⁴². Juntamente com ativação de RON, através de seus ligantes MSP, B1 integrinas podem fosforilar RON através da via Src dependente. A ativação de RON pode ser potencializada através de outros RTKs dos quais temos c-MET e receptores para crescimento epidérmico⁴³⁻⁴⁴. Heterodímeros de RON-MET têm sido observados no câncer gástrico (GTL-a6) onde tais células expressam altos níveis dos dois receptores³⁸. Estes heterodímeros

também permitem a sinalização sem a presença dos seus receptores ligantes associados.

Múltiplos mediadores de RON sinalizam as cascatas que envolvem a motilidade celular, adesão, proliferação e apoptose. As vias de ativação da diminuição da sinalização de RON incluem a proteína quinase ras-mitogênica-ativada (MARK), quinase fosfotidol inositol-3 (PI-3K)³⁷⁻⁴⁴⁻⁴⁵. Akt e via quinase de adesão focal (FAK). Ativação de RON pode também aumentar significativamente a atividade de c-Src, um sinalizante intermediário envolvido na progressão do ciclo celular, motilidade, angiogênese e sobrevivência³⁴⁻³⁸⁻⁴¹⁻⁴⁴.

Recentemente, um receptor truncado de RON (forma curta RON; sf – RON) faltando o domínio extracelular foi observado tanto em tecidos normais como de neoplasias. Através da reação de cadeia da transcriptase reversa (RT-PCR), um RON truncado foi encontrado sendo altamente expresso em cânceres de ovário e mama de humanos⁴⁶⁻⁴⁷. sf-RON demonstrou aumento da atividade intrínseca da tirosina quinase e foi constitutivamente fosforilado em células programadas para hiperexpressão sf-RON⁴⁸.

O ligante de RON é o MSP (Proteína Estimuladora de Macrófago) que foi inicialmente identificada como uma proteína que estimulava a quimiotaxia em peritonites de murinos mediada pelo fator do complemento C5a⁴⁸⁻⁴⁹.

2.2.1 Função biológica de RON

A ativação do RON pelo MSP pode iniciar a sinalização através de várias vias relacionadas com a progressão tumoral e disseminação, das quais a adesão, invasão, motilidade, proliferação e inibição da apoptose⁴⁹⁻⁵⁰. Além disso, a hiperexpressão e mutação de RON têm demonstrado seu papel potencial na carcinogênese e disseminação metastática⁵¹⁻⁵³.

2.2.1.1 Adesão

A capacidade de adesão celular é uma das características mais importantes para a manutenção da integridade estrutural dos epitélios. Uma função importante de RON é o seu envolvimento na adesão celular. MSP aumenta a adesão celular da fibronectina humana somente em células com RON expresso⁵³. Em cânceres de rim e cólon observou-se sua hiperexpressão⁵⁴⁻⁵⁵.

Outro estudo mostrou que MSP aumenta a afinidade de integrinas da matriz extracelular mais do que o número do aumento de integrinas⁴⁹. Esta observação foi confirmada pela observação de um nível inalterado da expressão da integrina B1 com estimulação de MSP. A adesão MSP- dependente necessitou da ativação de PI-3K e foi bloqueada por wortmannim, um inibidor PI-3K, numa concentração dependente⁵¹⁻⁵².

Ativação de RON também resulta na fosforilação de FAK através da sinalização e aumento da atividade da quinase associada à FAK. Contudo, a inibição de FAK não afeta a adesão potencializada por MSP, e isso implica que a fosforilação de FAK não é um fator crítico na adesão mediada por RON⁴⁹⁻⁵⁰.

A interação funcional entre RON e integrinas é muito comprovada por estudos usando células RE 7 (células MDCK com hiperexpressão- RON). Nestes estudos, RON foi avaliado com imunoprecipitação com B1 integrinas com células RE 7 MSP- estimulado e MSP- não estimulado, sugerindo que há relação funcional e física entre elas. Entretanto em células RE 7 aderidas ao colágeno, RON permaneceu constitutivamente fosforilado, e o grau de fosforilação foi dessa forma potencializado pela adição de MSP⁵². Esta interação funcional com a matriz extracelular foi inibida por anticorpos de B1 integrina. Similarmente às interações entre integrinas e outros RTKs, ambos FAK e Src mediarão a sinalização entre RON e integrinas. Formas dominantes negativas de FAK e Src diminuem o nível de integrinas- mediadoras de fosforilação de RON⁵⁴⁻⁵⁷.

2.2.1.2 Invasão e motilidade

Estudos têm demonstrado que RON está envolvido na invasão e na motilidade celular. Células normais do epitélio de cólon transfectadas (CoTr) com RON cDNA demonstraram aumento de migração e invasão após tratamento com MSP em dose dependentes³³. Em contraste às células RON-transfectadas CoTr, células deficiente-transfectadas não exibiram migração ou invasão em resposta ao MSP. Adicionalmente, linhagens HCT-116 de células de câncer colônico humano, as quais expressavam endogenamente RON, exibiram aumento de migração e invasão após estimulação com MSP³³⁻⁵⁸.

O aumento da migração e a invasão também foram demonstrados em células de carcinoma de mama humano que hiperexpressavam RON⁵³.

A habilidade da hiperexpressão de RON em potencializar a invasão celular e a migração denota a importância do RON na progressão do câncer, bem como a disseminação metastática⁵⁴⁻⁵⁹.

2.2.1.3 Mediação do RON na EMT

A transição do tecido epitelial para o mesenquimal (EMT) é o único processo observado no desenvolvimento embriológico e de carcinogênese, no qual as células perdem as características epiteliais e ganham propriedades mesenquimais⁶¹.

EMT é caracterizada pela perda de adesão celular e rearranjos do citoesqueleto normal. Morfologicamente, células epiteliais normais submetidas à EMT alteram sua forma cubóide para formas disformes⁶⁰⁻⁶¹. Esta transformação morfológica está associada com a perda de E-caderina e aumento da expressão de vimentina e actina da musculatura lisa (SMA)⁵⁴. A alteração da expressão de E-caderina, vimentina e SMA são mais características das células mesenquimais e não são usualmente observadas em células epiteliais não estimuladas. Quando as células epiteliais demonstram alterações EMT, presumidamente a transformação ocorreu de um fenótipo epitelial para um tipo de célula mesenquimal com maior

motilidade⁵³. Essas mudanças fenotípicas de EMT correlacionam com o aumento de motilidade e invasão⁵⁴. Adicionalmente, demonstrando significância funcional, EMT está também associada com a progressão tumoral e o pior prognóstico clínico⁽⁶¹⁾. Fator de Crescimento Tumoral (TGF) b1 e HGF são duas citocinas que têm sido demonstradas para induzir EMT⁵⁹⁻⁶¹.

O papel do RON na EMT foi investigado em células MDCK transfectadas com RON cDNA (células RE 7). A estimulação de células RE 7 com MSP mostrou aumento de células esparsas⁻⁵⁵⁻⁵⁸.

Através da técnica de imunofluorescência, células RE 7 tratadas com MSP demonstraram redistribuição de E-caderina, B-catenina e actina. Após 48h de exposição ao MSP, o nível de E-caderina foi reduzida em 50%⁵⁵.

As mudanças associadas com EMT devido à ativação de RON sustentam a capacidade do RON em aumentar a migração celular e invasão. Entretanto, essas mudanças fenotípicas observadas com MSP também são atribuídas ao RON na progressão e metástases⁵⁵.

2.2.1.4 RON – inibição da apoptose

Os gregos intrigavam-se com o fenômeno outonal da mudança de cor, textura e finalmente queda das folhas de algumas árvores. Entendiam que era um fenômeno diverso da morte de algumas árvores acometidas por processos patológicos. Chamaram a “morte” programada durante o inverno de *apoptosis*⁶².

A todo o momento, nos organismos pluricelulares, originam-se células com características neoplásicas, porém, mecanismos de autocontrole evitam que estas células se proliferem e desenvolvam massas tumorais. Um dos mecanismos é a indução destas células a morte programada – apoptose⁶².

A hiperexpressão de RON e ativação por MSP pode potencializar a habilidade das células em evitar a apoptose. Essas propriedades não apoptóticas do RON têm sido investigadas em células epiteliais do cólon malignas e não malignas³⁸.

Células epiteliais normais de cólon e CoTr potencializadas pela hiperexpressão de RON foram tratadas com a adição de Ac Fas para induzir apoptose. Com a adição de Ac Fas, ambos os tipos celulares submeteram a

formação DNA, dessa forma significando apoptose. Com a adição de MSP, entretanto, o efeito apoptótico observado na hiperexpressão de RON foi reduzido para 50%⁴⁴. Assim sendo, a hiperexpressão e ativação de ligantes de RON foram necessárias para inibir a apoptose mediada por Fas.

Em relação à via de sinalização anti- apoptótica, em células que expressam RON, MSP pode ativar ambas as vias de potencialização com efeitos anti- apoptóticos⁴⁴. Quando essas vias forem inibidas, MSP sinalizará a ativação através de vias alternativas de inibir a apoptose⁴⁹.

A aglutinação de células da membrana basal ou da matriz normal conduz à morte celular (anoikis), entretanto, células cancerígenas, nas mesmas situações, evitam a anoikia. Também as células cancerígenas metastáticas devem sobreviver na circulação, por essa razão, evitar a anoikia é uma propriedade crítica para a progressão do câncer⁴⁹⁻⁵⁰.

2.2.1.5 RON como um Oncogene

A transformação celular como resultante da hiperexpressão de RON tem sido demonstrada em modelos de ratos transgênicos⁵⁸. Ratos transgênicos foram criados para expressar RON somente no epitélio pulmonar distal usando a proteína promotora surfactante C- uma promotora específica do epitélio pulmonar. Esses ratos transgênicos cresceram normais, mas desenvolveram múltiplos adenomas pulmonares até o 2º mês de vida. Após o 4º. mês de vida, múltiplos nódulos se desenvolveram conduzindo-os à insuficiência respiratória no 14º. mês secundária à progressão tumoral do adenoma para adenocarcinoma⁵⁸. Nenhum outro tumor fora encontrado em outros órgãos e nos ratos controles. Análises imunoistoquímicas demonstraram que RON estava altamente expresso nos tumores e estava constitutivamente fosforilado. Pela seleção de super- regulação da expressão de RON em células pulmonares epiteliais de ratos transgênicos, a hiperexpressão de RON foi demonstrada como sendo oncogênica⁵⁸⁻⁵⁹. Ilustrado na figura 2.

sf-RON possivelmente também tenha a capacidade para transformar células, conduzindo ao desenvolvimento de neoplasias malignas⁴⁵. T74D- células transfectadas com sf-RON demonstrou construções alteradas morfológica e

fenotipicamente, com perda da expressão da E-caderina. Além disso, a presença de sf-Stk (homólogo de RON de ratos) em hemácias de ratos potencializou a susceptibilidade à eritroleucemia induzida por Friend leucemia viral ⁴⁶.

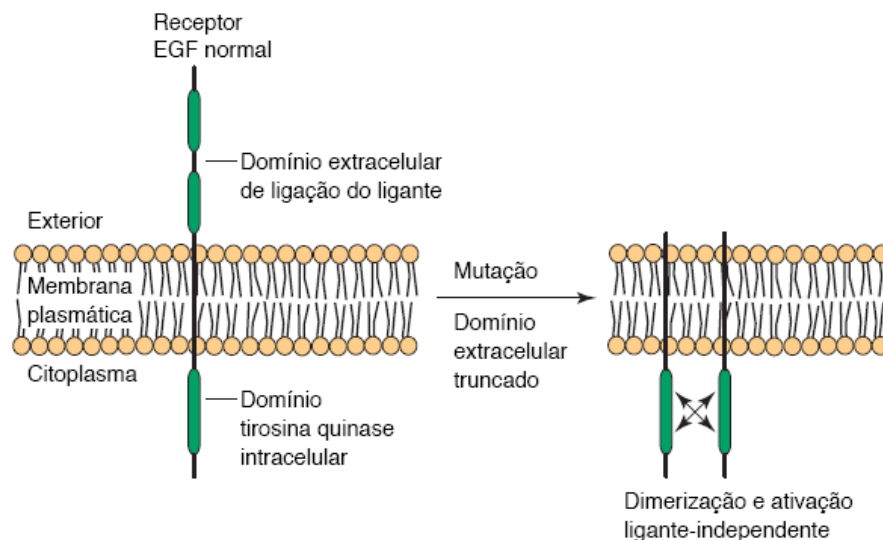


Figura 2- Formas mutadas de receptores tirosina quinases como produtos de oncogenes que causam câncer. Redesenhado com base em figura de Alberts, B., et al. *Essential Cell Biology*, 2nd ed. New York: Garland, 2004.

2.2.1.6 RON – mediador de metástases

Vários tipos de mutações na ativação de RON têm sido associados com a mediação de formação de metástases. Células NIH3T3 transfectadas tanto com o tipo selvagem de RON, como os três variantes mutados de RON com única substituição de aminoácidos, foram estudadas para avaliarem o papel do RON na mediação de transformação e progressão de metástases⁵⁸.

As mutações projetadas por RON foram homólogas às bem descritas mutações dos membros da família c-MET. Essas linhagens de células foram injetadas no subcutâneo e na extremidade distal das veias para lançar seu potencial de metástases in vivo ⁵⁹. Após injeção parenteral subcutânea das células NIH3T3, o surgimento de tumor ocorreu em somente 25% (1 de 4) dos ratos, enquanto a injeção parenteral subcutânea das células de linhagens transfectadas promoveram

tumores em 88% (22 de 25) dos ratos⁵⁹. Uma promoção de mutação in-vitro (L1176V) gerou a transformação de tumores em 58% dos ratos injetados, enquanto o tipo selvagem de RON e outras duas mutações geraram tumores em 100% dos ratos injetados⁵⁸. A mutação M1231T no domínio quinase de RON desenvolvem tumores com maior taxa de crescimento e um aumento relativo do índice mitótico do que outras mutações com linhagens de células transfectadas-RON⁵⁷. Em contraste à injeção subcutânea, a injeção venosa aumentou significativamente o número de metástases pulmonares com duas das formas de RON mutadas. Nenhuma metástase pulmonar fora identificada com a injeção de células não transfectadas ou em células com o tipo selvagem de RON⁵⁹.

2.2.2 Expressão do RON no Câncer

Estudos prévios indicaram que RON tem um potencial proeminente na progressão tumoral e metastatização³⁸⁻⁵⁴⁻⁵⁸. A fim de corroborar esta hipótese, é importante determinar se RON ou seus ligantes estão hiperexpressos em tecidos epiteliais malignos.

A hiperexpressão de RON foi primeiramente observada em 1998 em câncer de mama. Em análises imunoistoquímicas de espécimes de câncer de mama de humanos, aproximadamente 50% dos tumores tinham hiperexpressão de RON. Um equivalente grau de hiperexpressão fora observada tanto no carcinoma ductal como no lobular mamário⁵⁴. Em outros estudos foram também evidenciados que os cânceres mamários de mulheres pós menopausadas apresentavam uma hiperexpressão maior de RON do que os cânceres de mulheres pré-menopausada⁵⁵. Esta correlação é incerta, devido ao fato de que não foram encontradas correlação entre a expressão de RON e o estado dos receptores hormonais. Análise com *immunoblot* revelaram a presença de alterações genômicas ou ampliações, sugerindo que a hiperexpressão de RON resulta na potencialização da transcrição do gene⁵⁸. Esta demonstração inicial da hiperexpressão de RON em tumores humanos direcionou a atenção para o papel deste RTK no desenvolvimento do câncer.

Em carcinoma colorretal, adenocarcinomas demonstraram hiperexpressão de RON comparado com a mucosa das células normais. Em análises imunoistoquímicas, 29 (59,2%) de 49 espécimes de cânceres hiperexpressaram RON⁶². Importante salientar que nestes o RON foi difusamente presente no citoplasma das células, enquanto que em células epiteliais normais, RON está localizado na superfície celular e grânulos citoplasmáticos⁶²⁻⁴⁴. Nenhuma correlação foi observada entre a hiperexpressão de RON e características de câncer avançado de cólon, como profundidade de invasão e envolvimento vascular. Em análises *in vitro* mostrou-se que constitutivamente RON encontrava-se fosforilado com um aumento relativo da atividade das quinases³⁸⁻⁴⁴.

Apesar dos estudos demonstrarem que a hiperexpressão de RON possa conduzir ao aumento do potencial de metástases e invasão tumoral, a hiperexpressão de RON não está correlacionada às características de tumores mais agressivos em carcinomas colorretais e de mama³⁷⁻⁴². A presença e função de RON e MSP têm sido investigadas em células de carcinomas não pequenas células de pulmão (NSCLC)⁴⁵. Em espécies de NSCLC, RNAm de MSP é expressado em dois diferentes padrões: primeiro, o epitélio pulmonar normal pode expressar altos níveis de MSP RNAm adjacente ao tecido maligno. Esta relação foi demonstrada em três de oito análises de espécimes de NSCLC, assim sugerindo uma relação parácrina entre o tecido normal adjacente e o tumor. Segundo, a potencialização da expressão de MSP RNAm também é vista nas linhagens de células neoplásicas⁽⁵⁵⁾. De modo geral, RON estava presente em 62% (10 de 16) das linhagens de células cancerosas. Em cinco de 16 células da linhagem NSCLC, detectou-se co- expressão de RON e MSP RNAm, e isto sustenta a possibilidade de uma sinalização autócrina.

RON também tem sido observado hiperexpresso em carcinoma de ovário⁴³. Em 55% (29 de 53) de espécimes de tumores investigadas, RON hiperexpresso foi identificado por PCR-RT⁴³. Nenhuma correlação foi observada entre a hiperexpressão de RON e a progressão da doença⁴³⁻⁴⁵.

Como anteriormente exposto a hiperexpressão do RON tem sido demonstrada em vários estudos com diferentes amostras tumorais. Em relação ao câncer tireoidiano evidenciamos um número menor de estudos, principalmente se compararmos com os de câncer de mama. Em um estudo onde se avaliou a hiperexpressão do RON em 50 amostras de câncer tireoidiano (incluindo todos os tipos histológicos), observou-se que a hiperexpressão de RON resultou em um

aumento na formação de colônias de células tumorais e também mostrou uma correlação com o comprometimento linfonodal⁶⁵.

Dessa forma há evidente necessidade de maiores estudos analisando o marcador RON no intuito de se predizer suas correlações com o câncer de tireóide e posteriormente subsidiar dados para aquisição de novas terapias utilizando este receptor da tirosina quinase, como é atualmente realizado para o tratamento de inúmeros cânceres.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de RON- receptor de tirosina quinase em carcinoma papilífero de tireóide.

3.2 Objetivos específicos

- a. Verificar a correlação entre a hiperexpressão de RON com os achados anatomopatológicos das peças cirúrgicas dos pacientes com carcinoma papilífero de tireóide.
- b. Verificar a correlação entre a extensão (porcentagem de células coradas) do marcador RON com os achados anatomopatológicos das peças cirúrgicas dos pacientes com carcinoma papilífero de tireóide.
- c. Verificar a correlação entre a hiperexpressão de RON com o estadiamento clínico dos pacientes com carcinoma papilífero de tireóide.
- d. Verificar a correlação entre a extensão (porcentagem de células coradas) do marcador RON com o estadiamento clínico dos pacientes com carcinoma papilífero de tireóide.
- e. Verificar a correlação entre a hiperexpressão de RON com o comprometimento linfonodal dos pacientes com carcinoma papilífero de tireóide.
- f. Verificar a correlação entre a extensão de RON com o comprometimento linfonodal dos pacientes com carcinoma papilífero de tireóide.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostra (pacientes)

Foram selecionados os casos clínicos aleatoriamente nos arquivos do laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo do Hospital Universitário de Campo Grande (NHU-UFMS), no intuito de se obter 20 casos de carcinoma papilífero de tireóide, no período de 2004 a 2007. Dos 20 casos selecionados, um foi excluído do estudo, pois ao se realizar a confecção da lâmina para o estudo anatomopatológico não fora evidenciado tumor no corte histológico.

Após a seleção dos casos, os pacientes selecionados assinaram um termo de consentimento informado (Apêndice A - p. 72) para a realização da pesquisa e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UFMS.

4.2 Dados do Prontuário

Os seguintes dados dos pacientes selecionados foram pesquisados a partir de seus prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico do NHU- UFMS:

- Sexo
- Idade
- Cor
- Tipo de cirurgia realizada
- Dados anatomopatológicos da peça cirúrgica: tamanho da peça, multifocalidade tumoral, tamanho do tumor, característica tumoral quanto à presença de encapsulamento, comprometimento da cápsula tireoidiana, comprometimento de margens cirúrgicas pelo tumor, avaliação linfonodal.
- Estadiamento clínico-patológico

- Realização ou não da Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI)
- Avaliação de metástases
- Realização de iodoterapia adjuvante
- Seguimento oncológico.

Estes dados foram então registrados em uma Ficha de avaliação desenvolvida pela autora deste estudo (Apêndice B-p.74).

4.3 Análise histológica (amostras tumorais)

4.3.1 Preparo de blocos e lâminas

Para a realização do estudo histopatológico e imunoistoquímico dos espécimes foram utilizadas as técnicas rotineiras de inclusão em parafina, conforme metodologia recomendada por Michalany (Michalany, 1998)⁶⁷. Secções de 4µm de espessura foram realizadas em micrótomo rotatório (LEICA®, modelo RM-2155), e montadas em lâminas de vidro convencional – para a coloração padrão de hematoxilina-eosina (H&E) e em lâminas silanizadas (Surgipath®) – para o estudo imunoistoquímico. Após, as lâminas foram secas durante a noite, a 37⁰C, ou a 60⁰C por no mínimo 60 minutos para a realização da coloração ou da imunoistoquímica.

4.3.2 Análise histológica

Após a confecção das lâminas coradas pelo H&E, foi realizada a microscopia ótica através do microscópio óptico (Marca Nikon, modelo Elipse E200) com lente binocular, por dois patologistas para evidenciar a presença de tecido neoplásico maligno.

4.3.3 Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica utilizada foi a do complexo streptavidina-biotina (Burnier Júnior *et al.*, 1988; White, 1994; Alves, 1998) para a pesquisa e localização do antígeno RON nos tecidos embebidos em parafina, utilizando-se o anticorpo monoclonal RON (SC-322, Santa Cruz, CA, EUA) em diluição de 1:100.

Em resumo, o preparo do tecido para a técnica ABC, fosfatase alcalina conjugada foi o seguinte:

- a. Obtenção de cortes de 4 μ m de espessura, através de um micrótomo rotatório, com o auxílio do banho histológico e estufa de secagem.
- b. Desparafinização em xilol dentro da capela de exaustão de gases;
- c. Colocação em álcool absoluto dentro da capela de exaustão de gases;
- d. Reidratação em álcool graduado (95%) dentro da capela de exaustão de gases;
- e. Lavagem em tampão TRIS-HCL (pH 7,6).
- f. Resgate calor-induzido dos epítomos, com imersão em solução de citrato de sódio 10 mM com pH 6,0 e exposição em forno de microondas por 10 minutos.
- g. Banho com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 10 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena;
- h. Banho de 30 minutos em solução de albumina de soro bovino a 1% em tampão TRIS (pH 7,6) para bloquear as ligações não-específicas.
- i. Aplicação do anticorpo primário dentro da capela de exaustão de gases, com sua titulação, e incubação em câmara úmida (Fisher modelo SH197) a 4°C por 18 horas;
- j. Lavagem com solução de tampão TRIS-HCL (pH 7,6) por 5 minutos, por 2 vezes.

- k. Aplicação do anticorpo biotilado de coelho contra o anticorpo primário, em diluição de 1:500, seguida de incubação em câmara úmida a 37°C por 30 minutos;
- l. Lavagem com solução de tampão TRIS-HCL (pH 7,6).
- m. Aplicação do complexo avidina-biotina, fosfatase alcalina conjugado em diluição pronta do fabricante (DAKO), seguida de incubação em câmara úmida a 37°C por 30 minutos;
- n. Lavagem com solução de tampão TRIS-HCL (pH 7,6) por 5 minutos, por 2 vezes.
- o. Aplicação do cromógeno “fast red” (DAKO) por 30 minutos;
- p. Lavagem com água por 5 minutos;
- q. Contra coloração com Hematoxilina de Mayer (DAKO);
- r. Lavagem com água;
- s. Passagem em solução saturada de carbonato de lítio;
- t. Lavagem com água destilada;
- u. Montagem de lâmina com meio de *faramount* (DAKO).

As lâminas para controle negativo foram tratadas de maneira idêntica, porém sem a aplicação dos anticorpos primários. As lâminas de controle positivo consistiram em lâminas de um caso de adenocarcinoma de cólon, sabidamente positivo para o anticorpo pesquisado, conhecido por conter o antígeno de interesse.

4.3.4 Classificação da expressão imunoistoquímica do receptor RON

A intensidade e a extensão da expressão do marcador RON foram graduadas de acordo com método previamente estabelecido⁶⁶. Foi utilizada a técnica de contagem de pontos (*point counting*) semi-quantitativa, associada à análise ponderada subjetiva da intensidade de expressão⁶⁶⁻⁸².

A *intensidade* foi graduada de 0 a 3, sendo:

- 0: os caso sem nenhuma expressão – não apresentou coloração
- 1+: positivo fraco - casos que apresentaram expressão fraca e citoplasmática

- 2+: positivo moderado - casos que apresentaram expressão moderada e citoplasmática
- 3+: positivo intenso – casos que apresentaram expressão forte, citoplasmática e/ou membranosa

Consideramos como hiperexpressos aos casos positivo moderado e positivo intenso (2+ e 3+); os casos positivos fracos (+1) foram considerados como baixa expressão e os casos negativos como sem expressão do marcador.

A *extensão*, ou seja, o grau de porcentagem de células coradas, foi graduada de 0 a 3, sendo:

- 0: negativo
- 1+: positivo em 1% a 25% das células tumorais
- 2+: positivo em 25% a 50%
- 3+: positivo em mais que 50% das células tumorais.

Todas as lâminas foram avaliadas primeiramente por dois patologistas independentes, sem conhecimento das respectivas graduações. Em casos de discrepância entre as graduações, os patologistas revisaram as lâminas e a graduação foi realizada após um consenso.

4.3.5 Captura de imagem da microscopia

A microscopia ótica foi realizada utilizando-se Microscópio (Marca Nikon, modelo Elipse E200) com lente binocular com aumento 10X e objetiva no aumento 40X/0,65. Acoplado à câmera de vídeo (Marca SanSung, modelo SCC131); conexão ao microcomputador via placa de vídeo (Marca Pinnacle Studio PCTV – USB); microcomputador Duron 750 Mhz, 128 Mb Ram, HD 20 Gigabytes e sistema operacional Microsoft Windows 98 SE.

4.4 Análise estatística

Medidas de tendência central e de variabilidade foram utilizadas para descrever as variáveis numéricas e a distribuição de freqüências para as categóricas.

Para verificar a associação entre as variáveis numéricas com relação à intensidade e porcentagem de células coradas, foram usados os testes não paramétricos U de Mann-Whitney, e o teste de Kruskal-Wallis. Para comparar as variáveis categóricas, considerando a amostra menor que 30, foram utilizados o teste exato de Fisher, bem como o teste do Chi quadrado com e sem a correção de Yates (a correção se aplica aos casos de tabelas de contingência 2 X 2).

O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos.

Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos.

A linguagem R, usada na programação de computadores em aplicações estatísticas, foi utilizada para a realização de todas as análises estatísticas, inclusive a geração de gráficos e instantâneos dos cálculos. Foi usado o sistema operacional Linux Debian, sobre plataforma de hardware usando processador Intel Core 2 Duo.

Também se utilizou o programa estatístico para computadores STATA versão 7.0 na realização de algumas análises estatísticas⁶⁸, considerando diferenças e relações significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

4.5 Normas adotadas

Esta dissertação obedece:

As recomendações do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, segundo as Diretrizes para elaboração de Teses e Dissertações, elaborado por Zárate P, Andrade SMO, Aydos RD. Campo Grande. Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, 2008.

As normas de referências bibliográficas adaptadas do *International Committee of Medical Journals Editor* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos da *List of Journal Indexed in the Index Medicus*

5 RESULTADOS

Neste estudo foram avaliados 19 (dezenove) casos de pacientes com diagnóstico de carcinoma papilífero de tireóide, sendo que destes 89,5% (n = 17) eram do sexo feminino e 10,5% (n = 02) do sexo masculino.

A idade dos pacientes variou de 26 a 68 anos, com a idade média de 48,10 ± 13,05 anos (*Média ± Desvio Padrão da Média*). Encontramos 07 (sete) pacientes (36,8%) com idade inferior a 45 anos e 12 pacientes (63,2%) com idade superior a 45 anos.

Quinze (15) pacientes eram brancos e quatro (04) não brancos.

Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa das variáveis de identificação observadas.
Campo Grande – 2010

Variável	Categoria / Medidas	Medidas / Quantidade	Frequência Relativa
Idade (anos)	Mín - Máx	26 - 68	na
	Média	48,10	na
	Desvio Padrão	13,05	na
Gênero	Feminino	17	89,5%
	Masculino	2	10,5%
Etnia	Branco	15	78,9%
	Não branco	4	21,1%

na: não se aplica.

Todos os pacientes não apresentavam linfonodos clinicamente comprometidos na avaliação pré-operatória, sendo que 13 (treze) pacientes (68,4%) foram submetidos à Tireoidectomia Total, 05 (cinco) pacientes (26,3%) à Tireoidectomia Total com Esvaziamento Cervical Recorrential Unilateral e 01 (um) paciente (5,3%) à Tireoidectomia Total com Esvaziamento Recorrential Bilateral (Tabela 2).

Na análise anatomopatológica, o peso da glândula tireoidiana variou de 10 a 63 gramas. Estes resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tipo de cirurgia e peso glandular: medidas e frequências absoluta e relativa. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria / medidas	Medidas / frequência absoluta	Frequência relativa
Cirurgia	TT	13	68,4%
	TT + ECRU	5	26,3%
	TT + ECRB	1	5,3%
Peso (g)	Mín – Máx	10 – 63	na
	Média	26,2	na
	Desvio Padrão	11,0	na

TT: Tireoidectomia Total. ECRU: Esvaziamento Cervical Recorrential Unilateral. ECRB: Esvaziamento Cervical Recorrential Bilateral. na: não se aplica.

Em relação à multifocalidade tumoral, nesta amostra encontramos 10 (dez) casos (52,6%) com tumores com um único foco, e 09 (nove) casos com multifocalidade (47,4%), conforme ilustrado na Figura 3.

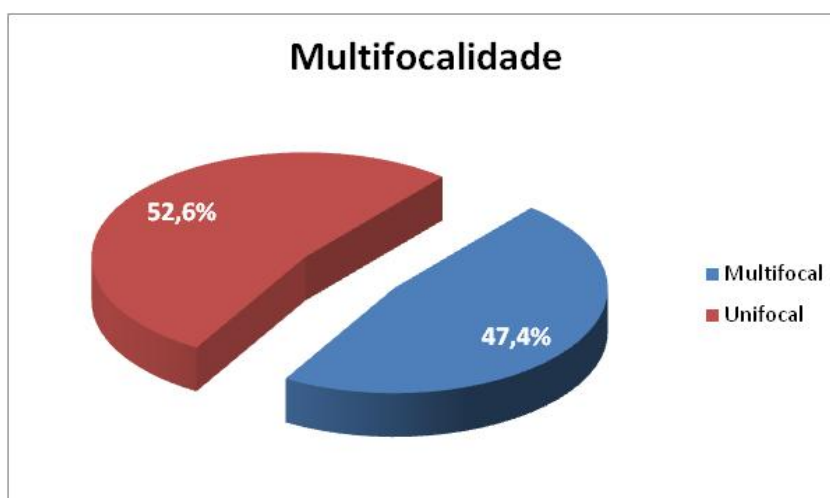


Figura 3 – Gráfico ilustrando a frequência relativa de multifocalidade

O tamanho dos tumores variou de 0,4 a 3,2 cm, com a média de $1,5 \pm 1,0$ cm (*Média $\pm$ Desvio Padrão da Média*).

Os tumores que apresentavam cápsula tumoral, ou seja, encapsulados, foram 63,2% (n=12).

O comprometimento da cápsula tireoidiana pelo tumor ocorreu em 47,4% (n=9) dos casos.

A ausência de comprometimento da margem cirúrgica ocorreu em 9 casos (47,4%), a presença de margens exíguas (menores do que 5 mm) ocorreu em 7 casos (36,8%) e margens tumorais comprometidas em 3 pacientes (15,8%).

A extensão tumoral a estruturas extras tireoidianas adjacentes ocorreu em 26,3% (n=5) dos casos. A presença de invasão vascular pelo tumor ocorreu em 6 casos (31,6%).

Dos 6 (seis) pacientes que foram submetidos a esvaziamento cervical (linfadenectomia), 5 (85%) apresentaram comprometimento linfonodal enquanto apenas um (15%) não apresentou comprometimento linfonodal. Nos demais pacientes (n=13), não houve indicação clínica para realização de esvaziamento cervical (Tabela 3).

Em relação à classificação TNM de tumores malignos da União Internacional Contra o Câncer (UICC-2004)⁶⁹, encontramos 31,6% (n=6) de tumores T1, 31,6% (n=6) de tumores T2 e 36,8% (n=7) de tumores T3. Nos casos onde foram realizados esvaziamento cervical (n=6), um caso foi N0 e 5 casos N1a (comprometimento de linfonodos do nível VI – recorrential unilateral).

Tabela 3 – Frequência absoluta e relativa de acordo com as características anatomopatológicas dos tumores avaliados. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Encapsulado	Não	7	36,8%
	Sim	12	63,2%
Cápsula	Não	10	52,6%
	Sim	9	47,4%
Margem	Comprometida	3	15,8%
	Exígua	7	36,8%
	Livre	9	47,4%
Extensão	Não	14	73,7%
	Sim	5	26,3%
Invasão	Não	13	68,4%
	Sim	6	31,6%
Linfonodos	Comprometidos	5	26,3%
	Não comprometidos	1	5,3%
	Não realizado	13	68,4%

Ao realizarmos a classificação TNM para carcinomas papilíferos de tireóide, (classificação que leva em consideração a idade – corte aos 45 anos – e as características tumorais⁶⁹), encontramos 47,4% (n=9) no estadio clínico I, 21,1% (n=4) no estadio clínico II e 31,6% (n=6) no estadio clínico III, conforme ilustrado na Figura 4.

No presente estudo, encontramos 7 pacientes (36,8%) com idade abaixo de 45 anos, e todos eram do estadiamento clínico I.

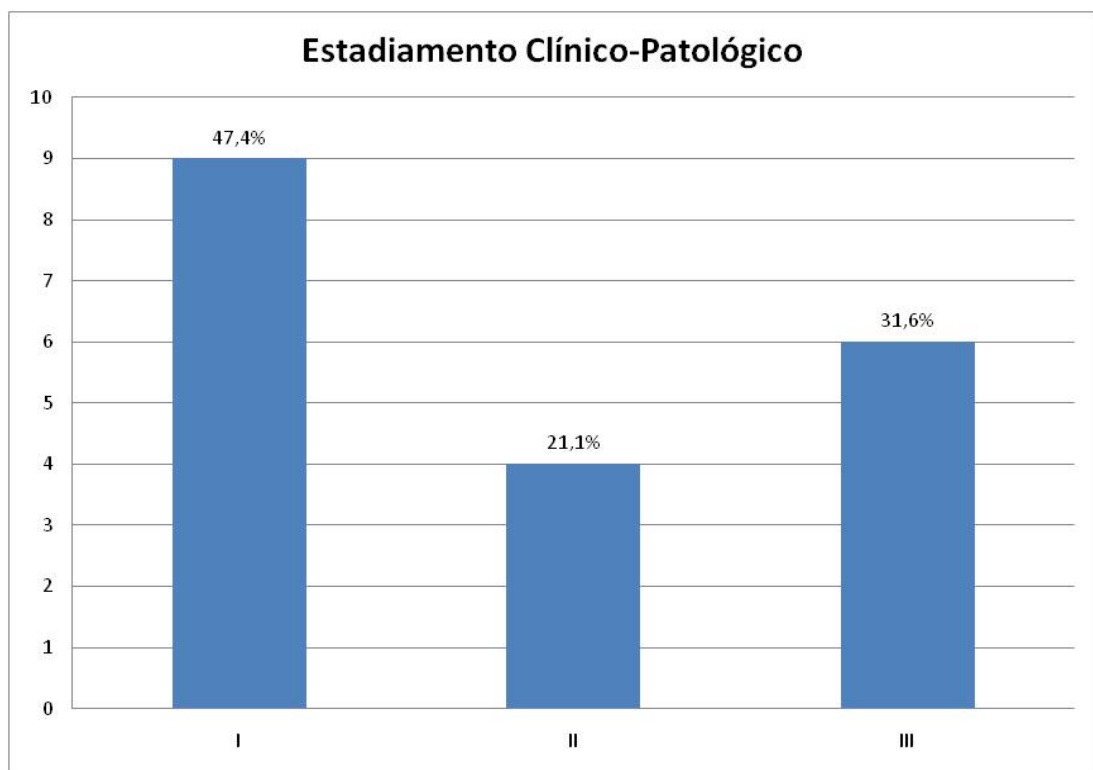
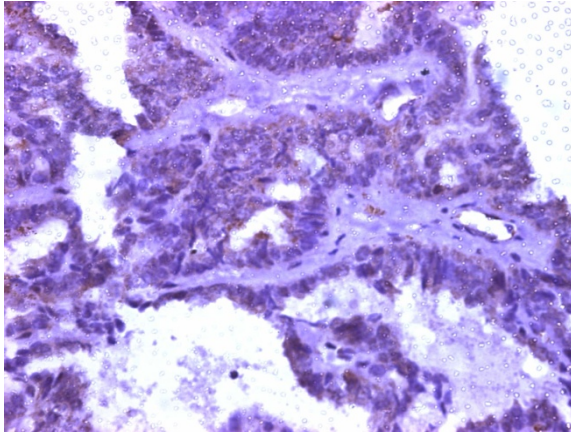
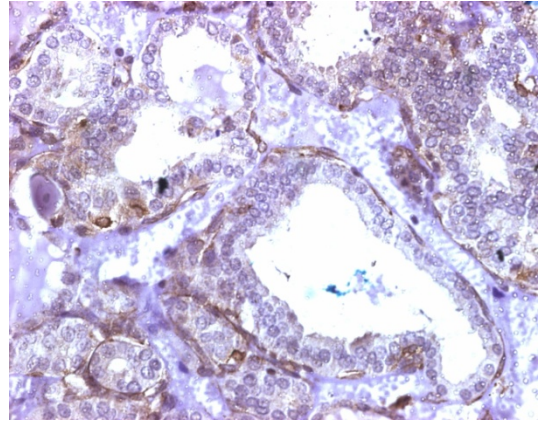


Figura 4- Gráfico mostrando a distribuição dos casos conforme o estadiamento clínico-patológico, UICC- 6ª. edição.

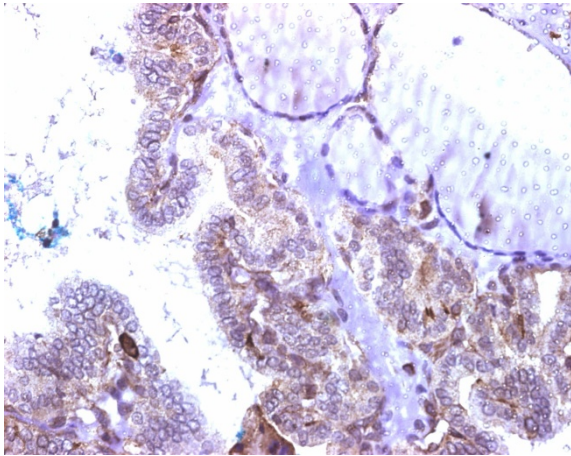
Quanto à expressão do RON, foi evidenciada em 100% dos casos (n=19). Destes, 68,4% (n=13) expressaram o RON fracamente (1+), e 31,6% (n=6) apresentaram hiperexpressão do RON (2+ e 3+). Conforme evidenciado nas fotomicrografias das lâminas- figura 5.



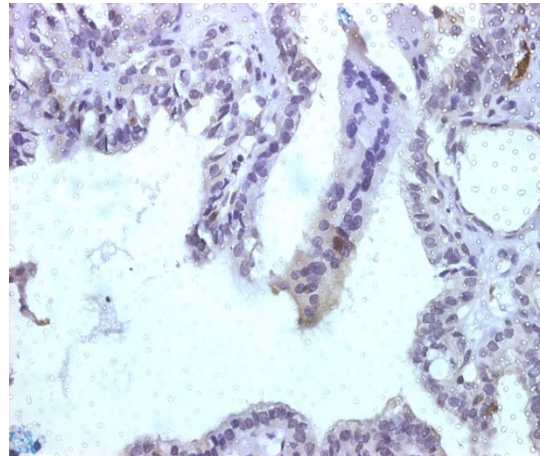
Caso – 11 Expressão 1+



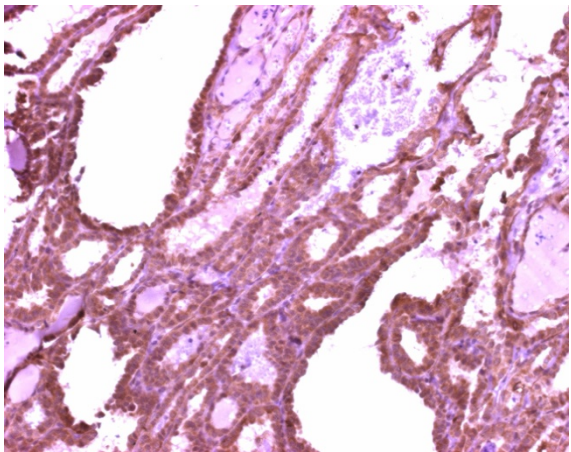
Caso – 19 Expressão 2+



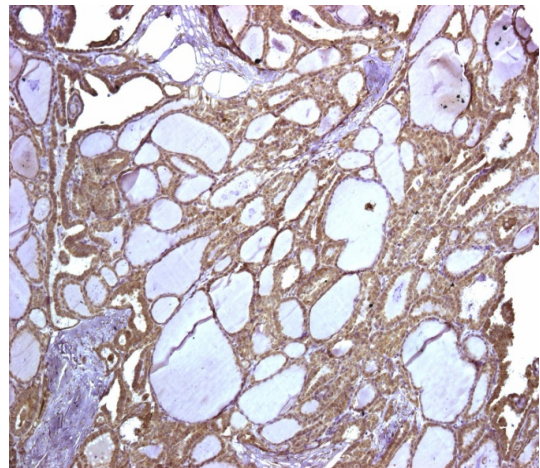
Caso – 3 Expressão 2+



Caso – 3 Expressão 2+



Caso – 4 Expressão 3+ HE



Caso – 4 Expressão 3+

Figura 5 - Fotomicrografias de lâminas coradas por imunohistoquímica para RON em aumento de 400X mostrado a expressão do marcador. Nota-se o colorido castanho no citoplasma e nucléolos dos tireócitos malignos.

Tabela 4 – Correlação da expressão do marcador RON com achados anatomopatológicos. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria	Intensidade (%)		Fisher	p-valor	
		1+	2+/3+		X ²	X ² Yates
Encapsulado	Não	3 (42,9)	4 (57,1)	0,128	0,067	0,187
	Sim	10 (83,3)	2 (16,7)			
Cápsula	Não	10 (100)	0 (0,0)	0,003	0,001	0,008
	Sim	3 (33,3)	6 (66,7)			
Margem	Comprometida	0 (0,0)	3 (100,0)	0,001	0,003	-
	Exígua	4 (57,1)	3 (42,9)			
	Livre	9 (100,0)	0 (0,0)			
Extensão	Não	12 (85,7)	2 (14,3)	0,017	0,006	0,031
	Sim	1 (20,0)	4 (80,0)			
Invasão	Não	8 (61,5)	5 (38,5)	0,604	0,342	0,675
	Sim	5 (83,3)	1 (16,7)			
Linfonodos	Comprometidos	3 (60,0)	2 (40,0)	1,000	0,438	0,698
	Não comprometidos	1 (100,0)	0 (0,0)			

Dos cânceres que não apresentavam cápsula tumoral 16,7% (n=2) foi evidenciada a hiperexpressão do RON, não houve relação estatística com p=0,19 (teste exato de Fisher).

O comprometimento da cápsula tireoidiana pelo tumor foi encontrado em 9 casos, sendo que 3 casos (33,3%) apresentaram expressão fraca de RON e 6 (66,7%) apresentaram hiperexpressão. Dos 10 pacientes que não apresentavam comprometimento capsular todos apresentaram uma expressão fraca de RON. Houve relação entre o comprometimento capsular e a hiperexpressão de RON (teste exato de Fisher, p=0,003). Ilustrado na tabela 4.

A presença de extensão extra tireoidiana pelo tumor foi evidenciada em 5 casos, onde 20% (n=1) o tumor apresentou expressão fraca de RON e 80% (n=4) apresentou hiperexpressão. Dos casos que não apresentaram comprometimento extra tireoidiano 85,7% (n=12) expressaram fracamente o RON. Este dado teve correlação com a hiperexpressão de RON (teste exato de Fisher, p=0,017). Tais resultados estão ilustrados na tabela 4.

A presença de invasão vascular pelo tumor foi encontrada em 6 casos, onde 83,3% (n=5) os tumores apresentavam expressão fraca de RON e 16,7% (n=1) exibiu hiperexpressão. Não houve correlação entre a invasão e a hiperexpressão de RON (teste exato de Fisher, p=0,604).

Dos 6 pacientes que foram submetidos a esvaziamento cervical recorrente, 5 apresentaram comprometimento metastático e destes 60% (n=3) apresentaram expressão fraca de RON e 40% (n=2) apresentaram hiperexpressão. Não houve correlação entre o comprometimento de linfonodos e a hiperexpressão de RON (teste exato de Fisher, p=1).

Em relação ao estadiamento clínico pelo TNM - UICC, remetendo ao T (Tumor), houve correlação estatisticamente significativa com a intensidade de expressão (Teste exato de Fisher, p=0,0003 e validado pelo Chi quadrado, p=0,0005). Conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 – Correlação da expressão do marcador RON com o T (tumor). Campo Grande – 2010

Tumor - T	Intensidade (%)		p-valor Fisher	X ²
	1+	2+/3+		
1	6 (31,57)	0 (0)		
2	6 (31,57)	0 (0)	0,0003	0,0005
3	1 (5,26)	6 (31,57)		

Ao agruparmos as características tumorais (T), linfonodais (N) e comprometimento metastático à distância (M) e classificarmos os casos em três grupos de estadiamento: I, II e III e ao correlacionarmos esse estadiamento com a expressão de RON evidenciamos que houve relação com significância estatística. (Teste Exato de Fisher, p=0,0067, validado pelo Chi quadrado, p=0,004). Demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Correlação da expressão do marcador RON com estadiamento clínico. Campo Grande – 2010

Estadio	Intensidade (%)		p-valor Fisher	X ²
	1+	2+/3+		
I	8 (42,10)	1 (5,26)	0,006	0,004
II	0 (0,00)	4 (21,05)		
III	1 (5,26)	5 (26,31)		

Ao avaliarmos a porcentagem de células tumorais coradas observamos que 68,4% (n=13) apresentaram um número maior do que 50% de células coradas expressando o marcador. Ilustrado na tabela 7. Ao correlacionarmos com a intensidade da expressão não houve significância estatística (teste exato de Fisher, p=0,109). Tabela 8

Tabela 7 – Frequência absoluta e relativa da intensidade da expressão e porcentagem de células coradas. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria / Medidas	Freq. (%) / Medidas
Intensidade	1+	13 (68,4)
	2+ 3+	6 (31,6)
% células coradas	1+ 2+	6 (31,6)
	3+	13 (68,4)

Tabela 8 – Correlação da intensidade da expressão do marcador RON com porcentagem de células coradas. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria	Intensidade Freq (absoluta e relativa)		p-valor (Fisher)
		1+	2+ 3+	
% células coradas	1+ 2+	6 (100,0)	0 (0,0)	0,109
	3+	7 (53,8)	6 (46,2)	

Ao avaliarmos a correlação das células coradas com a idade dos pacientes encontramos que os pacientes com tumores que apresentavam menos de 50% de células coradas possuíram uma mediana de 33 anos, enquanto que aqueles que apresentavam mais de 50% de células coradas a mediana foi de 56 anos, com $p = 0,0005$ pelo Teste exato de Fisher. Mostrado na tabela 9.

Tabela 9 – Correlação da porcentagem de células coradas com a idade, gênero e a etnia. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria / Medidas	% células coradas Freq (absoluta e relativa)		Fisher	p-valor	
		1+ 2+	3+		Mann-Whitney	Kruskal-Wallis
Idade (anos)	N	6	13	-	0,006	0,005
	Mín – Máx	26 – 50	30 – 68			
	Média	36,2	53,6			
	Desvio Padrão	9,8	10,6			
Gênero	Feminino	6 (35,3)	11 (64,7)	1	-	-
	Masculino	0 (0,0)	2 (100,0)			
Etnia	Branco	5 (33,3)	10 (66,7)	1	-	-
	Não branco	1 (50,0)	3 (75,0)			

Os casos de tumores multifocais que apresentaram uma porcentagem de células coradas menores do que 50% foram 11,1% ($n= 1$) e em 88,9% ($n=8$) demonstraram mais de 50% de células coradas. Em relação aos tumores unifocais não houve diferença entre a porcentagem de células coradas. Ilustrado na tabela 10.

Em relação ao tamanho tumoral não houve correlação com a porcentagem de células coradas, $p= 0,14$ pelo Teste de U de Mann Whitney. Mostrado na tabela 10.

O comprometimento das margens cirúrgicas pelo tumor apresentou significância estatística, sendo o Teste Exato de Fisher, $p=0,01$. Tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição da casuística de acordo com a porcentagem de células coradas. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria / Medidas	% células coradas Freq (absoluta e relativa)		p-valor				
		1+ 2+	3+	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney	Fisher	X ²	X ² Yates
Peso	Mín – Máx Média Desvio Padrão	18 – 63 32,7 17,0	10 – 32 23,2 5,6	0,451	0,478	-	-	-
Tumor	Multifocal Unifocal	1 (11,1) 5 (50,0)	8 (88,9) 5 (50,0)	-	-	0,141	0,068	0,184
Tamanho	Mín – Máx Média Desvio Padrão	0,4 – 3,1 1,4 1,3	0,7 – 3,2 1,6 0,9	0,146	0,158	-	-	-
Margens	Comprometida Exígua Livre	0 (0,0) 0 (0,0) 6 (66,6)	3 (100,0) 7 (100,0) 3 (33,3)	-	-	0,010	0,007	-

Tabela 11 – Correlação da porcentagem de células coradas com achados anatomopatológicos. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria	% células coradas		p-valor		
		1+ 2+	3+	Fisher	X ²	X ² Yates
Encapsulado	Não Sim	1 (14,3) 5 (41,7)	6 (85,7) 7 (58,3)	0,333	0,215	0,467
Cápsula	Não Sim	4 (40,0) 2 (22,2)	6 (60,0) 7 (77,8)	0,628	0,405	0,735
Margem	Comprometida Exígua Livre	0 (0,0) 0 (0,0) 6 (66,7)	3 (100,0) 7 (100,0) 3 (33,3)	0,010	0,007	-
Extensão	Não Sim	6 (42,9) 0 (0,0)	8 (57,1) 5 (100,0)	0,127	0,076	0,226
Invasão	Não Sim	4 (30,8) 2 (33,3)	9 (69,2) 4 (66,7)	1,000	0,911	0,675
Linfonodos	Comprometidos Não comprometidos	1 (20,0) 0 (0,0)	4 (80,0) 1 (100,0)	1,000	0,624	0,327

Setenta e cinco por cento dos pacientes foram submetidos à iodoterapia adjuvante e 25% (n= 05) não apresentavam indicação de tal terapêutica. A captação da Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI) variou de 0 a 5%, com média de 2,4%. Demonstrados na tabela 12.

Tabela 12 – Análise da Pesquisa de Corpo Inteiro e iodoterapia. Campo Grande – 2010

Variável	Categoria / Medidas	Medidas / Freq. (%)
PCI	Mín – Máx	0 – 5
	Média	2,4
	Desvio Padrão	1,4
Iodoterapia	Não	5 (25,0)
	Sim	15 (75,0)

O tempo de seguimento variou de 02 a 05 anos. Nenhum paciente apresentou durante o seguimento recidiva local ou metástase à distância. Todos os pacientes continuam em seguimento oncológico e vivos sem doença.

6 DISCUSSÃO

A etiologia do câncer é multifatorial, com fatores genéticos, comportamentais, ambientais e de estilo de vida interagindo para a promoção do tumor¹⁴. Conhecimentos da genética do câncer vieram rapidamente melhorar nosso entendimento sobre a biologia, os fatores de riscos individuais ou coletivos, o comportamento tumoral e a habilidade de se desenvolverem novas armas terapêuticas.

Neste estudo encontramos um predomínio de mulheres (n=17). Embora a proporção chegue a 8:1, este dado está de acordo com o encontrado na literatura, onde a relação estimada entre mulheres e homens em algumas regiões chega a 6:1¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶. Alguns trabalhos associam a maior incidência do carcinoma papilífero de tireóide em mulheres devido à ação proliferativa do estrogênio sobre as células da glândula tireóide³³.

O câncer de tireóide ocorre principalmente na faixa etária dos 45 a 50 anos, neste estudo a média de idade foi de 48,10 anos. Encontramos 36,8% (n=7) pacientes com idade inferior a 45 anos. Tais dados apresentam importância uma vez que a incidência maior do câncer de tireóide ocorre na quarta e quinta década de vida, sendo que, a idade é fator sabidamente de prognóstico relevante no carcinoma papilífero de tireóide¹³⁻⁷³⁻⁷⁸, onde os pacientes com idade inferior a 45 anos, independente de outros fatores apresentados sempre serão classificados no estadiamento clínico-patológico I e II⁶⁹, apresentando dessa forma melhor prognóstico do que os pacientes com idade superior a 45 anos.

O câncer de tireóide apresenta taxas de presença de multifocalidade de 30 a 80%¹⁶⁻¹⁹⁻⁷⁴ neste estudo encontramos 52,6% dos casos de multifocalidade. A presença de foco de multifocalidade é determinante para realização de iodoterapia¹³⁻¹⁹. A classificação de Ohio, um dos sistemas de classificação de estadiamento tumoral, utiliza a multifocalidade como variável para o estadiamento.¹³⁻¹⁹⁻²⁰

Encontramos neste trabalho uma taxa de hiperexpressão de RON de 31,6%, enquanto que os trabalhos de Wang e colaboradores evidenciaram 42% de hiperexpressão⁶⁵. Atualmente diversos estudos têm sido realizados a fim de determinar a expressão de RON em amostras de diferentes tipos de cânceres. Nesses estudos, entretanto, diferentes anticorpos, métodos e critérios foram

utilizados²⁹⁻³⁰⁻³¹⁻³⁵. Um estudo utilizando *western blotting* mostrou uma hiperexpressão de RON em 50% de amostras de câncer de mama, outro mostrou que RON estava expresso, não hiperexpresso, em 32% dos cânceres de mama⁷⁰⁻⁷¹. Outro estudo mais recente demonstrou que RON estava expresso em 100% dos casos de câncer de mama⁷³. As discrepâncias desses resultados foram atribuídas aos anticorpos, métodos e critérios utilizados na interpretação dos resultados nesses estudos. Além disso, diferentes formas para descreverem a expressão de RON também têm causado muitas dificuldades. Em nosso estudo ao adotarmos um método padronizado e semi-quantitativo, semelhante ao utilizado por Wang³¹⁻⁶⁵, poderá possibilitar a agregação de resultados com outros trabalhos para futuras metas-análises sobre RON e câncer de tireóide.

O padrão de expressão de RON no presente estudo foi interessante, houve a expressão em todas as amostras de cânceres, variando apenas na intensidade.

A hiperexpressão apresentou correlação estatisticamente significativa com a invasão capsular tireoidiana pelo tumor ($p= 0,003$). Sabemos que a capacidade das células tumorais de invadir cápsulas, estruturas vizinhas, atingirem vasos e implantarem em parênquimas e se multiplicarem está diretamente associado à alteração de alguns genes. Essa característica celular correlaciona-se com maior agressividade tumoral. A alteração de RON, demonstrada em vários trabalhos⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁹ atribui um papel importante a este receptor nesta função da carcinogênese.

A extensão extra tireoidiana, evidenciada em 25% dos casos apresentou correlação estatisticamente significativa com a hiperexpressão de RON, ($p= 0,017$). No novo estadiamento clínico-patológico TNM - UICC⁶⁹, a presença de extensão extra tireoidiana mínima (tumores de qualquer tamanho com extensão mínima para musculatura pré-tireoidianos ou tecidos moles adjacentes – T3) foi acrescentada como critério mudando assim o nível de estadiamento. Os trabalhos da literatura mostraram a significância da alteração de RON envolvido não só na tumorigênese, mas também como mediador da capacidade de potencializar as células tumorais na invasão de estruturas adjacentes, com maior capacidade de invasão de estruturas e metastatização⁵⁹⁻⁶¹.

Uns dos princípios básicos da cirurgia oncológica refere-se à obtenção de margens cirúrgicas livres, ou seja, a obtenção de uma ressecção tumoral completa

sem evidências de restos tumorais no leito operatório macroscópica e microscopicamente.

Ao nos referirmos à cirurgia de Oncologia de Cabeça e Pescoço, nem sempre tal princípio é factível, visto que, as estruturas anatômicas aí localizadas apresentam-se intimamente relacionadas e muito próximas. No câncer tireoidiano, o comprometimento maior das margens (grosseiramente comprometidas - com grandes extensões extras tireoidianas, envolvimento de traquéia e fascia profundas.) está relacionado com uma alta taxa de recidiva local e à distância¹⁹⁻⁷². As margens exíguas (menores do que 0,5mm) e as com comprometimento menor (avaliáveis apenas microscopicamente) demonstram uma características mais agressiva do tumor, no entanto os trabalhos relacionando este comportamento com os fatores prognósticos são poucos na literatura e não evidenciam impacto no prognóstico em relação as recidivas¹¹⁻³³⁻⁷³⁻⁷⁶.

Neste estudo ao correlacionarmos as margens tumorais com a expressão de RON, observamos que houve significância estatística pelo teste exato de Fisher, $p=0,0015$. Notamos que os pacientes que apresentavam margens comprometidas ($n=3$) todos hiperexpressaram RON (3+). Em relação à extensão do marcador (porcentagem de células coradas) também observamos relevância com $p=0,01$ pelo teste exato de Fisher, onde todos os pacientes com margens comprometidas apresentavam mais de 50% das células tumorais coradas.

A presença de linfonodos comprometidos, embora seja reflexo de uma maior agressividade tumoral, pois está intimamente relacionada à sua capacidade de invasão vascular e atingindo os linfonodos aí se fixarem e se multiplicarem, no câncer de tireóide não apresenta grande impacto no prognóstico desses pacientes¹³⁻⁷¹⁻⁷²⁻⁷³. A indicação da realização da linfadenectomia dependerá da presença de metástases clinicamente detectáveis no pré-operatório, tamanho do tumor e alterações macroscópicas, como a invasão de estruturas adjacentes evidenciadas no intra- operatório. Algumas escolas a indicam apenas quando há o comprometimento linfonodal clinicamente detectável⁷²⁻⁷³. Neste estudo, 13 pacientes não foram submetidos à linfadenectomia. Os seis pacientes que sofreram a linfadenectomia, cinco (85%) apresentaram comprometimento metastático. Ao correlacionarmos com a expressão do RON o caso sem comprometimento metastático apresentou expressão fraca de RON. Não houve significância estatística ao aplicarmos o teste exato de Fisher e Chi quadrado.

Em relação ao estadiamento clínico tivemos 47,1% (n=9) dos pacientes no estágio I, onde destes 88,9% (n=8) apresentaram expressão fraca de RON; nos pacientes no estágio III, 83,3% (n=5) tiveram hiperexpressão. Houve correlação com a expressão de RON, $p=0,0067$, pelo teste exato de Fisher, corroborando com os dados da literatura⁶⁵.

Nos últimos anos, o conhecimento da carcinogênese tireoidiana foi ampliado significativamente por estudos de biologia molecular, pela utilização da tireotrofina (TSH) recombinante no tratamento e seguimento pós-cirúrgico e pela identificação de formas familiares por estudos genéticos¹³⁻⁷⁴⁻⁷⁸. Esses estudos genéticos contribuíram não só para o entendimento da patogênese tumoral, mas também, para a predição do comportamento do tumor, auxiliando a escolha da conduta para o tratamento da doença. Ainda assim o conhecimento de eventos associados à progressão do tumor da tireóide é bastante limitado, haja vista, as evidências da evolução de adenoma para carcinoma. Desse modo, há uma grande expectativa de que a biologia molecular possa contribuir não só para o conhecimento dos eventos envolvidos na progressão desses tumores, mas também, para identificação pré-cirúrgica precisa dos nódulos malignos⁶⁵⁻⁷¹⁻⁸³.

A descoberta dos marcadores biológicos, com especial atenção aos receptores da tirosina quinases, onde já está estabelecido o papel importante destes receptores na carcinogênese e a constante utilização de droga alvos destes receptores em oncologia de mama, gastrointestinal⁸³, bem como a realização de protocolos experimentais para o carcinoma espinocelular recidivado e irresssecável da região de cabeça e pescoço tem proporcionado experiência clínica e estimulado novos estudos com esses receptores a fim de se identificar novas terapêuticas

Ao nos referirmos ao câncer tireoidiano há pelo menos três quinases – RET, BRAF e PI (3) que podem ser consideradas como alvo apropriado para serem inibidas por “terapias alvos”⁸³. O RON, também um receptor da tirosina quinase, e ao apresentar papel importante na carcinogênese tireoidiana também poderá ser objeto de pesquisa para eventual droga terapêutica na reversão da tumorigênese.

7 CONCLUSÕES

- a. A frequência da expressão de RON foi 100% (n=19). Treze casos (68,4%) apresentaram expressão fraca (1+) e 6 casos (31,6%) apresentaram hiperexpressão (2+ / 3+).
- b. Houve correlação da hiperexpressão do RON com os seguintes dados anatomopatológicos: Extensão extra tireoidiana (p=0,017), comprometimento da cápsula tireoidiana (p= 0,003) e margens cirúrgicas tumoral (p=0,001).
- c. Houve correlação da extensão do RON (porcentagem de células coradas) com as margens cirúrgicas tumoral (p=0,007).
- d. Houve correlação da hiperexpressão do RON com estadiamento clínico (p= 0,006) e com as características tumorais (T) (p=0,0003).
- e. Houve correlação da extensão do RON com o estadiamento clínico (p=0,047).
- f. Não houve correlação entre a hiperexpressão do RON e o comprometimento linfonodal (p=1).
- g. Não houve correlação entre a extensão do RON e o comprometimento linfonodal (p=1).

REFERÊNCIAS

1. Ferraz AR, Toledo AC, Cordeiro AC, Santos LRM, et al. Cirurgia de Cabeça e Pescoço. In: Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto. 4ª. ed. São Paulo: Savier; 1994. p. 519-629.
2. Junqueira LCU, Carneiro J. Glândulas endócrinas. In: Histologia Básica. 8ª. ed. São Paulo: Guanabara; 2005. p. 342-402.
3. Daves A, Asa GH, Cecil K. Fisiologia da glândula tireóide. In: Fisiologia Humana. 1ª. ed. São Paulo: Artmed; 2003. p. 436-510.
4. Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009. National Cancer Institute, 2006. Based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.[cited 8 marc 2009] Available from: <http://www.seer.cancer.gov/>
5. Greenlee RT, Murray T, Wingo PA. Cancer Statistics 2009. *Cancer Journal Clin.* 2009; 50(3):7-26.
6. NCI- Instituto Nacional do Câncer Norte Americano, posted to the NCI web site, 2010.[cited 2 set 2010]. Available from: <http://www.nci.gov/>
7. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro:INCA; 2009 [citado 8 set 2010]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versaofinal.pdf>.

8. Memon A, Berrington G A, Luqmani Y, Suresh A. Family history of benign thyroid disease and cancer and risk of Thyroid cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40(2):754-60.
9. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro APAV, Vaisman M. Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49:503-9.
10. Parker SL, Tong T, Boldgen S, Wingo PA. Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.* 1997;47:5-14.
11. Schlumberger MJ. Papillary and follicular tyroide cancer. *N Engl Journ Med.*1998; 338:297-306.
12. Feinmesser R,Lubin E, Segal K, Noyek. Carcinoma of thyroide in children- a review. *J Pediatr. Metabol.* 1997; 10(1): 561-9.
13. Kowalski L.P, Anelli A, Lopes L.F. Cancer da tireóide. In: Manual de Condutas Diagnósticas e Terapêuticas em Oncologia. 2ª. ed. São Paulo: Âmbito; 2002. p. 430-34.
14. Watson JD, Baker T, Bell SP, Gann A, Levine M. Alterações Genéticas.In: Biologia Molecular do Gene. 1 a. ed. Rio de Janeiro: Artmed; 2006. p. 138-146.

15. Stolf BS, Kowalski LP. Marcadores tumorais das neoplasias da glândula tireóidea. In: Carvalho, M.B. Tratado de Tireóide e Paratireóides. 1ª. ed. São Paulo: Rubio; 2007.p. 451-63.

16. Shaara AR, Sha, JP. Low risk differentiation thyroid cancer: The need for selective treatment. *Ann Surg Oncol*. 2001; 174(5): 20-26.

17. Buła G, Waler J, Niemiec A, Koziółek H, Bichalski W, Gawrychowski J. Diagnosis of metastatic tumours to the thyroid by fine needle aspiration biopsy. *Clin.Endocrinol*. 2009 Sep-Oct; 61(5):427-9.

18. Clayman GL, Lippman SM, Laramore GE, Hong WK. Head and neck cancer. In: Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, eds. Cancer Medicine. Burlington, Ontario: BC Decker Inc; 2000(1):1175-1220.

19. Filho JG, Kowalski LP, Ikeda MK. Carcinoma bem diferenciado de tireóide. In: Kowalski LP. Afecções Cirúrgicas do Pescoço. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 233-41.

20. Bisi H, Fernandes VS, Camargo RY, Brito T. The prevalence of unsuspected Thyroid pathology in 300 sequential autopsies, with special reference to the incidental carcinoma. *Cancer*. 1989;64(9):1888-93.

21. Kovacs GL, Gonda G, Vadasz G, Ludmany E, Unhin K, et al. Epidemiology of thyroid microcarcinoma found in a autopsy series conducted in areas of different iodine intake. *Thyroid*. 2005; 15 (2): 152-7.

22. Jogai S, Al-Jassar A, TemminL, Dey P, Adesina AO, Amanguno HG. Fine Needle aspiration cytology of the thyroid: a cytohistologic study with evaluation of discordant cases. *Acta Cyto*. 2005;49 (5): 483-8.

23. Suarez HG, Schulumberger, M. Oncogenes in human epithelial thyroid tumors. *J. Endo*. 1994;(17): 371-379.

24. Velculescu V E, Zang L, *et al*. Serial analysis of gene expression. *Scienc*. 1995; (270): 484-487.

25. Ito Y,Uruno T,TakamuraY,et al . Papillary microcarcinoma of the t hyroid with preoperatively detectable lymph node metastasis show significantly higher aggressive characteristics on imunohistochemical examination. *Oncology*. 2005; (68):87-96.

26. Wang SL, Chen WT, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase in t hyroid follicular neoplasms: an immunohistochemical study. *Endocr pathol*. 2005; 42(16): 211-218.

27. Robertson SC, Tynan JA, Donoghue D J. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet*. 2000; 16(1): 265-271.

28. O'Toole JM, Rabenau KE, Burns K, Lu D, Mangalampalli V, Balderes P. Therapeutic implications of a human neutralizing antibody to the macrophage stimulating protein receptor tyrosine kinase (RON), a c- MET family member. *Cancer Res*. 2006; 66:9162-9170.

29. Xu XM, Zhou YQ, Wang MH. Mechanisms of cytoplasm B –catenin accumulation and its involvement in tumorigenic activities mediated by oncogenic splicing variant of the receptor originated from Nantes tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2005; 280:25087-94.

30. Cheng HL, Liu HS, Chen HH, Hsu P Y, *et al*. Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transition-cell carcinoma of the bladders. *Br J Cancer* .2005; 92(12): 1906-1914.

31. Maggiora P, Lorenzato A, Francchioli S, Costa B, *et al*. The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinoma and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res*. 2003;288 (32):382- 389.

32. Smith BD, Haffty BG, Sasaki CT. Molecular markers in head and neck squamous cell carcinoma: their biological function and prognostic significance. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110(7):221-228.

33. Graff H. Carcinoma de tireóide pouco diferenciado: Novas Considerações Terapêuticas. *Arq Brás. Endocr Metab*. 2005;49(3): 711-1

34. Ward LS. Bases Moleculares das Neoplasias Bem diferenciadas da Tireóide. In: Carvalho MB, Tratado de Tireóide e Paratireóide. 1ª. ed. São Paulo. 2007. p. 433-40.

35. Wang MH, Wang D, Chen YQ. Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis* 200.; 24:1291–300.

36. Ronsin C, Muscatelli F, Mattei MG, Breathnach R. A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene*. 1993;8:1195–202.
37. Angeloni D, Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, et al. The soluble sema domain of the RON receptor inhibits macrophage-stimulating protein-induced receptor activation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 3726–32.
38. Comoglio PM, Tamagnone L, Boccaccio C. Plasminogen-related growth factor and semaphorin receptors: a gene superfamily controlling invasive growth. *Exp Cell Res*. 1999; 253: 88– 99.
39. Muraoka RS, Sun WY, Colbert MC, et al. The Ron/STK receptor tyrosine kinase is essential for peri-implantation development in the mouse. *J Clin Invest* 1999; 103:1277–85
40. Waltz SE, Eaton L, Toney-Earley K, et al. Ron-mediated cytoplasmic signaling is dispensable for viability but is required to limit inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001; 108:567–76.
41. Iwama A, Wang MH, Yamaguchi N, et al. Terminal differentiation of murine resident peritoneal macrophages is characterized by expression of the STK protein tyrosine kinase, a receptor for macrophage-stimulating protein. *Blood*. 1995; 86:3394–403.
42. Gaudino G, Avantaggiato V, Follenzi A, et al. The proto-oncogene RON is involved in development of epithelial, bone and neuro-endocrine tissues. *Oncogene*. 1995; 11:2627–37.

43. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPAR gamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol. Metab.* 2006; 91 (1):213-20.
44. Chen Q, Seol DW, Carr B, Zarnegar R. Co-expression and regulation of Met and Ron proto-oncogenes in human hepatocellular carcinoma tissues and cell lines. *Hepatology.* 1997; 26:59–66.
45. Bardella C, Costa B, Maggiora P, et al. Truncated RON tyrosine kinase drives tumor cell progression and abrogates cell-cell adhesion through E-cadherin transcriptional repression. *Cancer Res.* 2004; 64: 5154–61.
46. Rulli K, Yugawa T, Hanson C, et al. Ex vivo and in vivo biological effects of a truncated form of the receptor tyrosine kinase stk when activated by interaction with the friend spleen focus-forming virus envelope glycoprotein or by point mutation. *J Virol.* 2004; 78 (24): 4573–81.
47. Leonard EJ, Skeel AH. Enhancement of spreading, phagocytosis, chemotaxis by macrophage stimulating protein (MSP). *Adv Exp Med Biol.* 1990; 121(2): 181–94.
48. Leonard EJ, Skeel AH. Isolation of macrophage stimulating protein (MSP) from human serum. *Exp Cell Res.* 1992; 114: 117–26
49. Danilkovitch A, Skeel A, Leonard EJ. Macrophage stimulating protein-induced epithelial cell adhesion is mediated by a PI3-K-dependent, but FAK-independent mechanism. *Exp Cell Res.* 1999; 248: 575–82.

50. Danilkovitch-Miagkova A, Angeloni D, Skeel A, et al. Integrin-mediated RON growth factor receptor phosphorylation requires tyrosine kinase activity of both the receptor and c-Src. *J Biol Chem*. 2000;275:14783–6.

51. Liu D, Aguirre Ghiso J, Estrada Y, Ossowski L. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell*. 2002; 1: 445–57.

52. Boerner JL, Danielsen A, Maihle NJ. Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm. *Exp Cell Res*. 2003; 284:111–21.

53. Moro L, Dolce L, Cabodi S, et al. Integrin - induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130 Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem*. 2002; 277: 9405–14.

54. Scheumman GF, Hoang-Vu C, Cetin Y, et al. Clinical significance of E-cadherin as a prognostic marker In thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*.1995; 80 : 2168–72.

55. Wang D, Shen Q, Chen YQ, Wang MH. Collaborative activities of macrophage stimulating protein and transforming growth factor – beta 1 in induction of epithelial to mesenchymal transition: roles of the RON receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 2004; 23:1668–80.

56. Danilkovitch A, Donley S, Skeel A, Leonard EJ. Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:2218–27.
57. Danilkovitch-Miagkova A, Leonard EJ. Anti-apoptotic action of macrophage stimulating protein (MSP). *Apoptosis* 2001. 6:183–90.
58. Chen YQ, Zhou YQ, Fisher JH, Wang MH. Targeted expression of the receptor tyrosine kinase RON in distal lung epithelial cells results in multiple tumor formation : oncogenic potential of RON in vivo. *Oncogene.* 2002; 21:6382–6.
59. Peace BE, Hughes MJ, Degen SJ, Waltz SE. Point mutations and Overexpression of Ron induce transformation, tumor formation, and Metastasis. *Oncogene.* 2001; 20 : 6142–51.
60. Lin HS, Berry GJ, Fee WE Jr, et al. Identification of tyrosine kinases overexpressed in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg* 2004; 130(12):311–6.
61. Gotzmann J, Mikula M, Eger A, et al. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 2004; 566: 9–20.
62. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The cell cycle and programmed cell death. In: *Molecular biology of the cell.* 4a. ed. New York: Garland Science; 2002. p. 983-1026.

63. Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Har AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, et al. *N Engl J Med*. 2009; 347, 1999–2009

64. Lin EY, Jones JG, Li P, Zhu L, Whitney KD, Muller WJ, Pollard JW. *Am J Pathol*. 2003; 163: 2113–2126.

65. Wang MH, Lee W, Luo YL, Weis MT, Yao HP. Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in various epithelial cancers and its contribution to tumorigenic phenotypes in thyroid cancer cells. *Journal of Pathology* [online]. 2007 [cited 2008 jan 22]. Available from: <http://www.interscience.wiley.com>

66. Faing D, Marshall C, Anteca E, Di Cesare S, Odashiro AN, Bakalian S, Fern BF. Immune Expression and Inhibition of Heat Shock Protein 90 in Uveal Melanoma *Clin Cancer Res*. 2008; 14 (3) 73-9.

67. Michalany J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. In: Michalany J. *Técnica de Anatomia Patológica Geral*. 2ª. ed. São Paulo: Artes Médicas;1990. P. 35-9.

68. [STATA]. *StataCorp 2001, Stata Statistical Software*: Release 7.0, College Station, TX: Stata Corporation. Texas USA.

69. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg*. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p. Tradução de: *TNM: classification of malignant tumours*. (6th ed.).

70. Maggiora P, Marchio S, Stella MC, Belfiore A, *et al* Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma. *Oncogene*. 2003 16: 2927-33.
71. Caron NR, Clark OH. Pappillary Thyroid cancer: surgical management of lymph node metastasis. *Curr treat option Oncol*. 2005;6 (4):311-22.
72. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched- pair analysis. *Head and Neck* . 1996;18(2):127-32.
73. Shaha AR. Management of the neck in thyroid cancer. *Otolaringol Clin North Am*. 1998; 31(5):823-31.
74. Grebe SK, Hay ID. Thyroid cancer nodal metastases: Biologic significance and therapeutic considerations. *Surg Oncol Clin N Am*. 1996; 5(1): 43-63.
75. Noguchi S, Murakami N, Yamashita H, Toda M, Kawamoto H. Pappillary thyroid carcinoma: modified radical neck dissection improves prognosis. *Arch Surg*. 1998; 133(3): 276-80.
76. Iida F. Recent advances in surgical treatment thyroid cancer. *Nippon Geka Gekka*. 1998; 89(9): 1343-6.
77. Cady B. Risk factor analysis in differentiated thyroid cancer. *Cancer*. 1979;43:810-9.

78. Shaha AR, Sha JP, Loree TR. Patterns of failure in differentiated thyroid cancer based on risk group. *Head and Neck*.1998; 20(1):20-36.
79. Souza DAT, Freitas HMP, Muzzi M, Carvalho ACP, Marchiori E. Punção aspirativa por agulha fina por ultrassonografia de nódulos tireoidianos: estudo de 63 casos. *Radiol. Bras.* 2004; 37(5): 333-5.
80. Shaha AR, Sha JP, Loree TR. Differentiated thyroid cancer presenting initially with distant metastasis. *Am J Surg*.1997;174 (5):472-6.
81. Haigh PI, Urbach DR, Rotstein LE. AMES Prognostic index and extend ofthyroidectomy for well-differentiated thyroid cancer in the United States. *Surgery*. 2004; 136(3):609-16.
82. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosi. *Apmis*. 1998; 96(5):379-94.
83. Santoro M, Fusco A. New drugs in thyroid cancer. *Arq.Bras. Endocrinol. Metab.* 2007; 51(5):857-61.

GLOSSÁRIO

BRAF	Proto-oncogene Serina-treonina-proteína quinase B-Raf (do inglês Serine / threonine-protein kinase B-Raf). Ele tem um papel importante na regulação da MAP-cinase/ERKs, as quais afetam diretamente a divisão celular, diferenciação e receptação.
c-Met	Proto-oncogene que codifica a proteína receptor do fator de crescimento de hepatócito (HGFR- do inglês: Hepatocyte Growyh Factor Receptor). MET é um receptor da tirosina cinase. Este proto oncogene está envolvido na transformação tumoral, na angiogênese e na metastatização tumoral.
c- Sea	Proteína presente em galinhas. Responsável pela codificação do receptor da tirosina cinase – c-SEA, expresso na superfície celular.
c-Src	Proto-oncogene da família das tirosina quinases envolvida na fosforilação da Tyr-504. Possui funções na embriogênese e no crescimento celular.
Fas	Proteína da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral. Liga-se ao receptor Fas e desencadeia a apoptose.
FAK	É a proteína Quinase de Adesão Focal, envolvida nos processos de adesão celular e metastatização tumoral (do inglês: Focal Adhesion Kinase).
HGF	Fator de crescimento de Hepatócito (do inglês: Hepatocyte Growth Factor Receptor). Relacionado com o crescimento celular, morfogênese e motilidade celular. Ativado pela cascata da tirosina cinase.
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos responsáveis pela regulação da expressão gênica, mitoses, diferenciação celular (do inglês: Activated Protein Kinases)
MET	Pertencente à família das proteínas quinase responsáveis pela regulação de várias atividades, tais como a regulação da expressão gênica, mitoses entre outras. Importante na carcinogênese tireoidiana. (do inglês: Mitogen Protein Kinases)

MSP	Proteína Estimuladora de Macrófago (do inglês: Macrophage-Stimulating Protein)
PCI	Pesquisa de Corpo Inteiro. Método da medicina nuclear que utiliza iodo radioativo em baixas doses para realização de pesquisa- evidência de metástases em pacientes submetidos à tireoidectomia total.
PI-3K	É uma proteína envolvida na função celular de crescimento celular. Quinase fosfotidol-inositol-3 (do inglês: Phosphatidylinositol 3-kinases)
RAS	Proto-oncogene da super família RAS, a qual corresponde a uma série de enzimas que hidrolisam os aminoácidos guanina e triptofano-GTPases. São importantes à proliferação celular, fenótipo celular e uma série de eventos envolvidos na transcrição celular
RET	Proto-oncogene codificador de um receptor da tirosina quinase
RON	Receptor da tirosina quinase envolvido no fenótipo celular humano. Pertencente à família MET
RTKs	Receptores da tirosina quinases. Existem aproximadamente 20 classes diferentes de recptores da tirosina quinases identificados
RT-PCR	É uma variante da reação em cadeia da polimerase reversa, útil nas amplificações de DNA. (do inglês: Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction)

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão do receptor de tirosina quinase- RON em câncer de tireóide

Nome do (a) Pesquisador(a): Rosana Leite de Melo

Nome do (a) Orientador (a): Ricardo Dutra Aydos

Natureza da pesquisa: Você está sendo convidado a participar deste estudo que tem como finalidade avaliar a expressão de um receptor, substância presente nos seres humanos, no material (peça cirúrgica) que fora retirado durante a sua cirurgia (Tireoidectomia).

Envolvimento na pesquisa: Será garantido esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa, a respeito da metodologia (desenvolvimento da pesquisa), assim como poderá consultar o pesquisador responsável acima identificado, sempre que julgar necessário obter informações ou esclarecimentos em relação ao projeto de pesquisa e participação no mesmo.

Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa não traz riscos nem desconfortos, será apenas avaliado a presença ou ausência daquela substância (receptor). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à dignidade do paciente.

Confidencialidade: Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e o orientador terão conhecimento dos dados. O nome não será relatado. Os resultados obtidos durante da coleta dos dados serão mantidos em sigilo, mas fica liberada a divulgação em publicações científicas, uma vez que os dados pessoais não serão mencionados tendo como garantia o sigilo quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, assegurando-lhe absoluta privacidade, preservando o anonimato. Sendo a imagem parte necessária do estudo, fica liberada consentida a divulgação dessas em publicações científicas desde que seja preservada a identificação do sujeito.

Benefícios: ao participar desta pesquisa a família e responsável não terão nenhum benefício direto, entretanto, esperamos que este estudo evidencie informações importantes sobre a presença da hiper expressão do receptor comparando-o com o estágio clínico o que poderá contribuir com outras pesquisas no desenvolvimento de terapias alvo em oncologia.

Pagamento: Não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa. Não gerará ônus adicional ao SUS, apenas será feita uma coleta dos dados do prontuário do paciente. Tem garantido o direito de tomar conhecimento, pessoalmente, do(s) resultado(s) parcial (is) e final (is) deste estudo.

Fica garantido o direito de renúncia, sem qualquer prejuízo a imagem do paciente a qualquer momento. Em caso de dúvidas quanto a sua participação, entre em contato com a pesquisadora Rosana Leite de Melo (8407-2638) e/ou Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS (3345-7187).

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar deste estudo preenchendo os itens que se seguem:

DECLARAÇÃO

Eu,

_____,
portador(a) do RG N° _____, DECLARO para fins de participação na pesquisa, na condição de sujeito objeto da pesquisa ou representante legal do sujeito objeto da pesquisa, _____
que fui devidamente esclarecido do Projeto de Pesquisa intitulado Avaliação da expressão do receptor de tirosina quinase – RON em câncer de tireóide, desenvolvido por Rosana Leite de Melo, médica oncologista do Núcleo do Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da UFMS e Dr Ricardo Dutra Aydos – Orientador da pesquisa do Núcleo do Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da UFMS.

Campo Grande, _____ de _____ de 200____.

Participante da pesquisa e/ou responsável

Rosana Leite de Melo – Pesquisadora responsável

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

Número no estudo()

RGH.....()

Idade (anos)()

Cor: (a) branca (b) não branca()

Sexo: (a) Fem (b) Masc()

Naturalidade:

Procedência:.....

Cirurgia: (1)Tireoidectomia parcial direita (2)Tireoidectomia parcial esquerda
(3)Istmectomia (4)Tireoidectomia Total (5)Tireoidectomia Total + Esvaziamento
Recorrencial Unilateral (6)Tireoidectomia Total + Esvaziamento Recorrencial
Bilateral (7)Tireoidectomia Total + Esvaziamento Cervical Funcional Unilateral
(8)Tireoidectomia Total + Esvaziamento Cervical Funcional Bilateral.....()

Número da biópsia.....

Diagnóstico (a) Bócio Colóide (c) Carcinoma papilífero (d) Carcinoma folicular
(e) Carcinoma Medular (f) Adenoma folicular()

Tamanho da peça (cm)()

Peso da peça (g)()

Tumor (a) unifocal (b) Multifocal (c) Multicêntrico.....()

Tamanho do tumor (cm)()

Coprometimento capsular (a) sim (b) não()

Margens: (a) livres (b) exíguas (c) comprometidas()

Linfonodos: (a)Não realizou esvaziamento (b)comprometidos
(c)não comprometidos.....()

Estadiamento patológico pT.....N.....M..... PCI (%)()

Metástases à distância (a) não (b) pulmão (c) osso (d) cérebro()

Iodoterapia (a) sim (b) não()

Seguimento (a) sim (b) perda de seguimento()

Recidiva (a) não (b) local (c) loco-regional (d) distância.....()

Última consulta: _____/_____/_____

Situação atual: (a) Perda de seguimento (b) vivo sem doença (c) vivo com doença
(d)óbito por neoplasia (e) óbito por outras causas()

ANEXO A – ESTADIAMENTO CLÍNICO

Definitions of TNM

The American Joint Committee on Cancer (AJCC) has designated staging by TNM classification to define thyroid cancer.

Table 1. Primary Tumor (T)

TX	Primary tumor cannot be assessed.
T0	No evidence of primary tumor.
T1	Tumor ≤ 2 cm in greatest dimension limited to the thyroid.
T1a	Tumor ≤ 1 cm, limited to the thyroid.
T1b	Tumor > 1 cm but ≤ 2 cm in greatest dimension, limited to the thyroid.
T2	Tumor > 2 cm but ≤ 4 cm in greatest dimension, limited to the thyroid.
T3	Tumor > 4 cm in greatest dimension limited to the thyroid or any tumor with minimal extrathyroid extension (e.g., extension to sternothyroid muscle or perithyroid soft tissues).
T4a	Moderately advanced disease. Tumor of any size extending beyond the thyroid capsule to invade subcutaneous soft tissues, larynx, trachea, esophagus, or recurrent laryngeal nerve.
T4b	Very advanced disease. Tumor invades prevertebral fascia or encases carotid artery or mediastinal vessels.
T4a	Intrathyroidal anaplastic carcinoma.
T4b	Anaplastic carcinoma with gross extrathyroid extension.

Table 2. Regional Lymph Nodes (N)

NX	Regional lymph nodes cannot be assessed.
N0	No regional lymph node metastasis.
N1	Regional lymph node metastasis.
N1a	Metastases to Level VI (pretracheal, paratracheal, and prelaryngeal/Delphian lymph nodes).
N1b	Metastases to unilateral, bilateral, or contralateral cervical (Levels I, II, III, IV, or V) or retropharyngeal or superior mediastinal lymph nodes (Level VII).

Table 3. Distant Metastasis (M)

M0	No distant metastasis.
M1	Distant metastasis.

Table 4. Anatomic Stage/Prognostic Groups

Stage	T	N	M
<i>Papillary or follicular (differentiated)</i>			
YOUNGER THAN 45 YEARS			
I	Any T	Any N	M0
II	Any T	Any N	M1
45 YEARS AND OLDER			
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0

Stage	T	N	M
	T2	N1b	M0
	T3	N1a	M0
	T4a	N1b	M0
IVB	T4b	Any N	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1
<i>Medullary carcinoma (all age groups)</i>			
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
III	T1	N1a	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0
	Stage IVB	T4b	Any N
IVB	T4b	Any N	M0
IVC	Any T	Any N	M1
<i>Anaplastic carcinoma</i>			
IVA	T4a	Any N	M0
IVB	T4b	Any N	M0
IVC	Any T	Any N	M1

ANEXO B- GRUPOS DE RISCOS CONFORME SHAHA, 1998.

Table 14–6. RISK GROUPS IN THYROID CANCER	
Low Risk	Low risk patients/low risk tumors
Intermediate Risk	Low risk patient/high risk tumor
	High risk patient/low risk tumor
High Risk	High risk patient/high risk tumor
Patient Factors	Age, Gender
Tumor Factors	Grade, Size, Extrathyroidal extension, Distant metastasis

Table 14–7. RISK-GROUP DEFINITIONS IN DIFFERENTIATED CARCINOMA OF THE THYROID				
	Low Risk	Intermediate Risk	High Risk	
Age (years)	<45	<45	>45	>45
Distant metastasis	M0	M+	M0	M+
Tumor Size	T1, T2 (≤4 cm)	T3, T4 (>4 cm)	T1, T2 (≤4 cm)	T3, T4 (>4 cm)
Histology and grade	Papillary	Follicular and/or high-grade	Papillary	Follicular and/or high-grade
5-Year survival	100 %	96%	96%	72%
20-year survival	99%	85%	85%	57%