

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

SÁVIO DE MORAES

**Estudo das histonas H4K12ac e H3K36me3 em neoplasias da tireóide:
comparação entre tipos histológicos e comportamento metastático**

UBERLÂNDIA

2014

SÁVIO DE MORAES

**Estudo das histonas H4K12ac e H3K36me3 em neoplasias da tireóide:
comparação entre tipos histológicos e comportamento metastático.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
e Estrutural Aplicadas, do Instituto de Ciências
Biomédicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso.

UBERLÂNDIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M827e 2014 Moraes, Sávio de, 1965-
Estudo das histonas H4K12ac e H3K36me3 em neoplasias da tireóide:
comparação entre tipos histológicos e comportamento metastático / Sávio
de Moraes. -- 2014.
85 f : il.

Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Histonas - Teses. 3. Tireóide - Câncer - Teses.
I. Cardoso, Sérgio Vitorino. II. Universidade Federal de Uberlândia. Pro-
grama de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
III. Título.

CDU: 576.3

Aos meus pais, Saulo e Valdivina, minha
esposa Luciana e meus filhos Vinícius e
Pedro; os primeiros por me oferecerem o
caminho e o modo de caminhar; aos outros por
iluminarem meu caminho e tornarem a
caminhada mais leve, prazerosa e motivadora.

Menção especial à minha mãe, hoje ausente,
de quem herdo e copio a alegria, a motivação e
a grande confiança em Deus, na vida e no
viver. Dor e Saudade...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso, pela dedicação e cuidado na condução de nossos trabalhos. Dele levo mais que ensinamentos acadêmicos, pois conviver com ele significa estar perto da serenidade, cordialidade, postura, respeito, honestidade e muita paciência. Isso torna a vida melhor.

Aos colegas de projeto, João Paulo Silva Servato, Juliana Mota Pereira e Tamiris Sabrina Rodrigues, pela constante e sempre pronta ajuda em todas as fases do trabalho. A ciência e a vida acadêmica precisam e vivem de pessoas como vocês.

Aos professores e orientadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, pela importância dos ensinamentos e auxílio incondicional. Menciono de modo particular os professores Paulo Rogério de Faria e Adriano Mota Loyola, pela proximidade e amizade que cultivamos.

Não poderia deixar de registrar também meu agradecimento ao Dr. Sindeval José da Silva e Dra. Veruska Tavares Terra Martins Silva, companheiros de luta constante e caminhada conjunta no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UFU. Apoio indispensável, amizade e compreensão.

Aos meus familiares e amigos, pela constante confiança em meu trabalho e as revigorantes horas de alegria e descontração. Menção especial aos meus irmãos (Saulo Jr, Jacqueline e Luiz Alessandro) e seus familiares; também a família de minha esposa (Sr. Celso, Sérgio e Heloisa) e seus familiares. Suas presenças em minha vida são força e alento.

Luciana, cujo nome tem raiz no latim *lux*. Obrigado por ser a luz do meu caminho, não só na execução desse trabalho, mas em todo o trabalho, dividido, de uma vida, em especial na condução de nossos filhos, Vinícius e Pedro. Merecê-la é maior presente que já recebi. Obrigado por tudo!

Pai e Mãe, muito obrigado! Vocês são faróis que não permitem que meu barco perca o rumo no reto caminho do bem. Além do apoio fundamental e da crença inabalável própria dos pais, o afeto e amor a mim dedicados me obrigam a buscar ser melhor a cada dia, e fazem com que eu sinta a presença de Deus em minha vida.

A Ele meu mais importante agradecimento. ‘Tudo posso, naquele que me fortalece’.

Tenho amigos que não sabem o quanto são meus amigos.
Não percebem o amor que lhes devoto
e a absoluta necessidade que tenho deles.

A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor,
eis que permite que o objeto dela se divida em outros afetos,
enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que não admite a rivalidade.

E eu poderia suportar, embora não sem dor,
que tivessem morrido todos os meus amores,
mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!

Se alguma coisa me consome e me envelhece
é que a roda furiosa da vida
não me permite ter sempre ao meu lado,
morando comigo, andando comigo,
falando comigo, vivendo comigo,
todos os meus amigos, e, principalmente,
os que só desconfiam
- ou talvez nunca vão saber -
que são meus amigos!

(Vinícius de Moraes)

RESUMO

O diagnóstico pré-operatório de nódulos tireoidianos permanece, em alguns casos, um desafio. Atualmente, a punção biópsia por agulha fina, seguida da citologia, é o procedimento de escolha, mas sua aplicação mostra limitações. Por isso, é extremamente instigante e motivadora a ideia de identificar alterações moleculares que possam distinguir nódulos tireoidianos benignos dos malignos.

Alterações epigenéticas, em especial as modificações pós-traducionais de histonas, desempenham um papel importante no controle da expressão gênica, e as células cancerosas exibem mudanças nos padrões dessas modificações. Poucas informações estão disponíveis sobre as modificações de histonas presentes nas neoplasias da tireóide e sobre a relação entre tais modificações e a agressividade do tumor.

Este estudo avalia o padrão de expressão e relevância biológica das modificações de histonas H4K12ac e H3K36me3, em tecidos de neoplasias tireoidianas e tireóide normal, através da imuno-histoquímica. Nele evidencia-se que, reatividade para H4K12ac é um evento observado em todas as amostras de tireóide normal, adenomas e carcinomas de tireoide, não sendo possível sua utilização como um marcador para essas neoplasias. A H3K36me3 mostra maior marcação no tecido normal em comparação às neoplasias, fato que aponta para um possível papel dessa marca de histona na tumorigênese tireoidiana. Diferente dos outros tecidos, que mostram marcação nuclear, o carcinoma oncocítico apresenta marcação citoplasmática, para ambas as moléculas, além de marcação mais intensa para H3K36me3. A associação dessas histonas à membrana mitocondrial pode ser o evento que determina tais diferenças.

ABSTRACT

The preoperative diagnosis of thyroid nodules remains, in some cases, a challenge. At present, fine needle aspiration biopsy, followed by cytology, is the gold standard, but its application is limited. It is therefore extremely motivating the idea to identify molecular changes that can distinguish malignant from benign thyroid nodules.

Epigenetic alterations, particularly histone modifications, play an important role in control of gene expression, and cancer cells exhibit alterations in these modifications patterns. Little information about histone modifications in thyroid neoplasms and relationship between such modifications and the tumor aggressiveness is at present available.

This study evaluates the expression pattern and biological relevance of histone modifications H4K12ac and H3K36me3, in thyroid tumors and normal thyroid tissues, by immunohistochemistry. Here it is evidenced that, reactivity to H4K12ac is an event observed in all samples of normal thyroid, thyroid carcinomas and adenomas, so it is not possible use this modification as a marker for these neoplasms. The H3K36me3 shows level of staining higher in normal tissue as compared to neoplasms, a fact that suggests a possible role of this histone mark on thyroid tumorigenesis. Unlike other tissues, that show nuclear staining, carcinoma oncocytic exhibits cytoplasmic staining, to both molecules, as well as a higher level for H3K36me3. Association between histones and mitochondrial membrane could be an event that determines such differences.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Glândula tireóide em sua posição anatômica (fonte: www.fapes.com.br)	21
Figura 2 - Representação da histologia da glândula tireóide (fonte: http://pt-br.aia1317.wikia.com)	22
Figura 3 - Estrutura das histonas do núcleo octamérico e histonas de ligação com o DNA (fonte: http://goo.gl/VpP1b8 , modificada acrescentando caudas N-terminais).	31
Figura 4 - Esquema da disposição das histonas e do DNA no centro do nucleossomo (Fonte: http://goo.gl/yhy3OI).	31
Figura 5 – Compactação da cromatina na fibra de 10nm (Fonte: http://goo.gl/bZ21kh).	32
Figura 6 – Cromatina interfásica à microscopia eletrônica: (A) fibra de 30 nm, (B) fibra de 10 nm – “colar de contas”. (Fonte: Alberts, 2008)	32
Figura 7 – Representação da cauda N-terminal de histona, exibindo modificações pós-traducionais em resíduos específicos: AC - acetilação, Me - metilação e P - fosforilação (Fonte: http://goo.gl/xEexjt)	33
Figura 8 – Efeito da acetilação e desacetilação de histonas no nucleossomo (Fonte: http://goo.gl/92uGqt).	34
Figura 9 - Reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac em adenoma (A), carcinoma papilífero (B), carcinoma oncocítico (C) e carcinoma metaplásico (D) de tireóide. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 500×.	51
Figura 10 - Reatividade imuno-histoquímica para H3K36me3 em adenoma (A), carcinoma papilífero (B), carcinoma oncocítico (C) e carcinoma metaplásico (D) de tireóide. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 500×.	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos tumores de tireóide, segundo a Organização Mundial da Saúde (Delellis, 2004).	24
Quadro 2 – Associações descritas entre metilações de histonas e a transcrição gênica.	35
Quadro 3 - Estudos recentes publicados relacionando modificações de histonas e o prognóstico de neoplasias malignas (Chervona e Costa, 2012)	36
Quadro 4 – Distribuição dos casos selecionados, segundo natureza das amostras biológicas, tipo histológico dos tumores e sexo dos pacientes. Quadro 03 – Casuística selecionada para o presente estudo.	45
Quadro 5 – Parâmetros, classes e valores utilizados para avaliação das reações imunoistoquímicas (DETRE <i>et al.</i> , 1995).	47
Quadro 6 – Classes de valores utilizados para avaliação quickscore QI (DETRE <i>et al.</i> , 1995).	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos dos pacientes avaliados, agregados conforme a natureza da amostra biológica avaliada.	50
Tabela 2 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à compartimentalização subcelular da reatividade imuno-histoquímica para as moléculas H4K12ac e H3K36me3.	53
Tabela 3 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à proporção de reatividade imuno-histoquímica para a molécula H4K12ac.	55
Tabela 4 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à proporção de reatividade imuno-histoquímica para a molécula H3K36me3.	55
Tabela 5 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à intensidade de reatividade imuno-histoquímica para a molécula H4K12ac.	56
Tabela 6 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à intensidade de reatividade imuno-histoquímica para a molécula H3K36me3.	56
Tabela 7 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto o índice combinado (Quickscore, QI) de reatividade imuno-histoquímica para as moléculas H4K12ac e H3K36me3	58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Comparação entre carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireóide segundo a compartimentalização subcelular da reatividade para a molécula H4K12ac ($p < 0,0001$; teste exato de Fisher). **54**
- Gráfico 2 – Comparação entre carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireóide segundo a compartimentalização subcelular da reatividade para a molécula H3K36me3 ($p < 0,0002$; teste exato de Fisher). **54**
- Gráfico 3 – Comparação entre amostras de tecido tireoidiano normal e neoplasias de tireóide segundo a intensidade da reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,02$; teste exato de Fisher). **57**
- Gráfico 4 – Comparação entre amostras de carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireóide segundo a intensidade da reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,03$; teste exato de Fisher). **57**
- Gráfico 5 – Comparação entre amostras de tecido tireoidiano normal e neoplasias de tireóide segundo o índice Quickscore de reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,02$; teste exato de Fisher). **59**
- Gráfico 6 – Comparação entre amostras de carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireóide segundo o índice Quickscore de reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,01$; teste exato de Fisher). **59**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetros – Unidade de medida
Ac	Acetilação (ac)
ADP	Adenosina difosfato
<i>BRAF</i>	Gene que codifica a proteína B-Raf
<i>BRCA1</i>	Gene humano relacionado ao câncer de mama (<i>breast câncer 1</i>)
CASTLE	Sigla da nomenclatura em inglês referente a “Carcinoma com elementos timo-símile”
CBP	Proteína coativadora de transcrição (<i>CREB-binding protein</i>)
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CoA	Coenzima A
C-terminal	Caboxi-terminal
<i>DAB2ip</i>	Gene que codifica a proteína de mesmo nome (<i>Disable homolog 2-interacting protein</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	etilenodiaminotetracético
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i> – uma metiltransferase
FA	Do inglês <i>follicular adenoma</i> – adenoma folicular da tireóide
FTC	Do inglês <i>follicular thyroid carcinoma</i> – carcinoma folicular da tireóide
G1	Primeiro período do ciclo celular onde ocorre a síntese de enzimas e outras proteínas, antes da duplicação do DNA,(Gap – intervalo)
H1	Histona do tipo H1
H2A	Histona do tipo H2A
H2B	Histona do tipo H2B
H3	Histona do tipo H3
H3K18ac	Histona 3 acetilada na lisina 18
H3K27ac	Histona 3 acetilada na lisina 27
H3K27me2	Histona 3 dimetilada na lisina 27

H3K27me3	Histona 3 trimetilada na lisina 27
H3K36me3	Histona 3 trimetilada na lisina 36
H3K4me	Histona 3 metilada na lisina 4
H3K4me2	Histona 3 dimetilada na lisina 4
H3K4me3	Histona 3 trimetilada na lisina 4
H3K9ac	Histona 3 acetilada na lisina 9
H3K9–K14ac	Histona 3 acetilada nas lisinas 9 e 14
H3K9me	Histona 3 metilada na lisina 9
H3K9me2	Histona 3 dimetilada na lisina 9
H3K9me3	Histona 3 trimetilada na lisina 9
H4	Histona do tipo H4
H4K12ac	Histona 4 acetilada na lisina 12
H4K16ac	Histona 4 acetilada na lisina 16
H4K20me	Histona 4 metilada na lisina 20
H4K20me2	Histona 4 dimetilada na lisina 20
H4K20me3	Histona 4 trimetilada na lisina 20
H4K3me2	Histona 4 dimetilada na lisina 3
H4K5ac	Histona 4 acetilada na lisina 5
H4K8ac	Histona 4 acetilada na lisina 8
H4R3me2	Histona 4 dimetilada na arginina 3
HAT	<i>Histones Acetyltransferases</i> – Histonas-acetiltransferase ou acetiltransferase de histonas
HCU	Hospital de clínicas de Uberlândia
HDAC	<i>Histones Deacetylase</i> – Histonas-desacetase ou desacetilase de histonas
HDM	<i>Histones demethylase</i> – Histonas-desmetilase ou desmetilase de histonas
HMT	<i>Histones methyltransferase</i> – Histonas-metiltransferase
HMT G9a	<i>Histone methyltransferase</i> G9a - Histona-metiltransferase G9a

HP1	Proteína de heterocromatina tipo 1
H-score	<i>Histo-score</i>
IS	<i>Intensity of staining</i> - Intensidade da marcação
kDa	Kilo-Daltons – unidade de massa atômica
mDNA	DNA mitocondrial
Me	Metilação (me)
mm	Milímetros – unidade de medida
mM	Milimolares – Unidade de medida de concentração
MMR	<i>Mismatch repair</i> – Reparos de incompatibilidade do DNA
<i>MORF</i>	Gene que codifica proteína de mesmo nome (<i>mortality fator</i>)
MSI	<i>Microsatellite instability</i> - instabilidades microssatélites, condição de hipermutabilidade no DNA
<i>NIS</i>	<i>Gene Na⁺/I⁻ symporter</i> - Simportador de sódio/iodeto
Nm	Nanômetros – Unidade de medida
NT	Do inglês <i>Normal Thyroid</i> – tireoide normal
N-terminal	Amino-terminal
P	Fosforilação
p300	Proteína coativadora de transcrição com massa molecular de 300 kDa e que atua em conjunto com a CBP
<i>p53</i>	Gene que codifica uma proteína citoplasmática de 53 kDa
PAAF	Punção aspirativa com agulha fina.
pb	Pares de bases
PPC	Proporção de células positivas
PSI	Unidade de medida de pressão no sistema inglês
PTC	Do inglês <i>papillary thyroid cancer</i> – Carcinoma papilífero da tireóide
<i>PTEN</i>	Gene que codifica proteína do mesmo nome - <i>phosphatase and tensin homolog</i> .
QI	<i>Quickscore</i>
<i>RAS</i>	Gene que codifica a proteína Ras – <i>rat sarcoma virus</i>

<i>RASSF1A</i>	Gene que codifica proteína similar à Ras – <i>Ras association-containing protein 1</i>
<i>RET/PTC</i>	Gene mutado que leva ao carcinoma papilífero da tireoide – <i>Receptor tyrosine – papillary thyroid cancer</i>
RNA	Ácido ribonucléico
<i>RUNX3</i>	Gene que codifica proteína do mesmo nome - <i>Runt-related transcription factor 3</i>
S	Fase do ciclo celular onde ocorre a duplicação do DNA - <i>Synthesis</i>
SAM	Cofator enzimático envolvido na metilação - <i>S-adenosylmethionine</i> – S-adenosilmetionina
SCCP	Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
SETTLE	Sigla da nomenclatura em inglês referente a “Tumor epitelial fusiforme timo-símile”
<i>SUV39H1</i>	Gene que codifica a metiltransferase de mesmo nome, envolvida na metilação de resíduos de histonas
<i>SUV39H2</i>	Gene que codifica a metiltransferase de mesmo nome, envolvida na metilação de resíduos de histonas
T3	Hormônio tri-iodotironina.
T4	Hormônio tetra-iodotironina ou tiroxina.
<i>TIMP3</i>	Gene que codifica proteína de mesmo nome - <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 3</i>
TMA	Do inglês <i>tissue microarray</i> - arranjos teciduais em matriz
TRIS-HCl	Abreviatura do composto tris(hidroximetil)aminometano e hidróclorídrico – trata-se de uma solução tampão.
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i> – Hormônio estimulante da tireóide.
TTF-1	<i>Thyroid transcrip. factor 1</i> - fator de transcrição 1 da tireóide
UC	Do inglês <i>undifferentiated carcinoma</i> – carcinoma indiferenciado
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1.	A glândula tireoide e suas neoplasias.....	21
2.1.1.	<i>Anatomia.....</i>	21
2.1.2.	<i>Histologia.....</i>	22
2.1.3.	<i>Neoplasias.....</i>	22
2.1.4.	<i>Fatores prognósticos dos carcinomas diferenciados da tireoide.....</i>	25
2.1.5	<i>Fatores genéticos envolvidos na neoplasia tireoidiana.....</i>	26
2.2.	Modificações globais de histonas.....	29
2.2.1.	<i>As histonas.....</i>	30
2.2.2.	<i>Modificação de Histonas.....</i>	33
2.2.3	<i>Modificações de histonas e as neoplasias.....</i>	35
2.3	Alterações epigenéticas e o carcinoma da tireóide.....	39
3	OBJETIVOS.....	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1.	Definição dos casos de interesse.....	44
4.2.	Matrizes teciduais.....	45
4.3.	Imuno-histoquímica.....	46
4.4.	Análise da imunomarcção.....	47
4.5.	Tabulação de resultados e análise estatística.....	48

5	RESULTADOS.....	50
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXOS.....	78
	ANEXO I – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa.....	79
	ANEXO II – Dados clínicos e resultados da análise da imuno- histoquímica para as modificações de histonas H4K12ac e H3K36me3 em neoplasias da tireoide.....	83

1 - INTRODUÇÃO



1 – INTRODUÇÃO

O diagnóstico pré-operatório de nódulos tireoidianos permanece, em alguns casos, um desafio, pois os meios diagnósticos disponíveis são muitas vezes insuficientes. Atualmente, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), seguida da citologia, é o procedimento de escolha para essas circunstâncias. Seu uso rotineiro reduziu as taxas de tireoidectomias desnecessárias para pacientes com doenças benignas e tem indicado melhor os pacientes com carcinoma para uma cirurgia apropriada. Antes dessa rotina, o percentual de neoplasias malignas entre os nódulos operados era de 14% (HAMBERGER, 1982); atualmente esse valor ultrapassa os 50% (YASSA, 2007). Apesar dos benefícios da citologia, sua aplicação nos tumores foliculares ou tumores de células de Hürthle mostra limitações, uma vez que não distingue os tumores benignos dos malignos em 3% a 6% de todas as punções (CIBAS e ALI, 2009). Além disso, alguns resultados de citologia sugerem, mas não diagnosticam definitivamente, o câncer papilar de tireoide, como ocorre nos resultados classificados como Bethesda V.

Por isso, é extremamente instigante e motivadora a ideia de identificar alterações moleculares que possam distinguir nódulos tireoidianos benignos dos malignos (GROGAN, 2010).

Nesse campo, surge espaço para a pesquisa epigenética em tumores tireoidianos (GROGAN, 2010). Poucas informações estão disponíveis sobre as modificações de histonas presentes nas neoplasias da tireoide e sobre a relação entre tais modificações e a agressividade do tumor (CATALANO, 2012). Recentemente, apenas um estudo descreveu a relevância da acetilação de histonas nessas doenças (PUPPIN, 2011). Por isso, encontramos nesse cenário, um vasto campo de trabalho específico para a neoplasia da tireoide, o que dá motivação e sentido ao presente estudo.

2 – Revisão da Literatura



2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A glândula tireoide e suas neoplasias

2.1.1. *Anatomia*

A tireoide é uma glândula endócrina única, constituída por dois lobos unidos pelo istmo, assumindo uma forma semelhante à da letra “H”. Está localizada medianamente na região anterior do pescoço, na porção superior da traqueia, logo abaixo da cartilagem laríngea. Seus lobos estão posicionados lateralmente em ambos os lados da traqueia e o istmo anteriormente à mesma. No adulto pesa de 15 a 40g, com volume de 8 a 15 cm³ (GRAY, 1988). Por sua localização superficial pode ser palpada, especialmente em pessoas magras. Sua forma e posição deram origem à sua denominação - tireoide (do grego *thyreós*, “escudo”, e *eidés*, “semelhante a”), muito embora tal denominação tenha sido primeiramente utilizada por Galeno para descrever a cartilagem próxima à glândula (REZENDE, 2005).

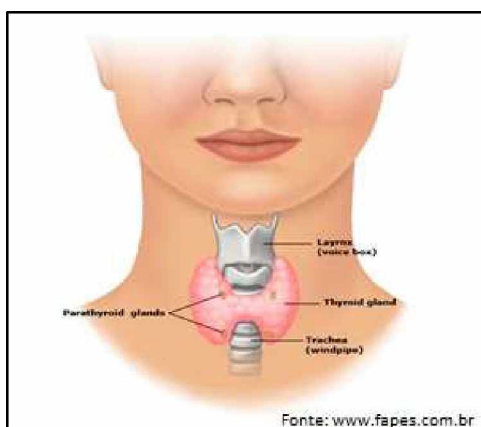


Figura 1 – Glândula tireóide em sua posição anatômica (fonte: www.fapes.com.br)

Cada um dos lobos tem um formato quase cônico, com o ápice votado para cima e para trás e a base dirigida para baixo e medialmente, sendo estes constituídos por muitos lóbulos, com vascularização própria. Os lóbulos, por sua vez, são compostos por 20 a 40 folículos, que são as unidades primárias do epitélio secretor, em cujo interior é armazenado seu produto para liberação controlada na corrente sanguínea (CURIONI, 2007).

A tireoide é uma glândula altamente vascularizada, irrigada por ramos das artérias carótidas (artérias tireóideas superiores) e ramos das subclávias (artérias tireóideas inferiores) de cada lado. Sua drenagem venosa se dá por três pares principais de veias tireoidianas, mas que podem ser múltiplas ou até assumir a forma de plexos venosos, que drenam para as jugulares internas e para os troncos venosos braquiocéfálicos. A primeira estação de drenagem linfática

da tireoide é representada pelos linfonodos do compartimento central do pescoço, que se compõe dos linfonodos justatireoideos, pré-laríngeos, pré e paratraqueais. As estações subsequentes são as cadeias jugulares médias e baixas de cada lado, e os mediastinais superiores. (CURIONI, 2007).

2.1.2. *Histologia*

A tireoide é caracterizada por dois tipos celulares, com funções diferentes: as células foliculares e as parafoliculares. As células foliculares se dispõem em camada única delimitando folículos bem individualizados, com lúmen preenchido por coloide, cujo principal componente é a tireoglobulina. Nos folículos são produzidos e armazenados os hormônios tiroxina (T4) e tri-iodotironina (T3). As células parafoliculares, também conhecidas como células C, ocupam o espaço interfolicular, junto com tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. Essas células, que derivam da crista neural, produzem calcitonina, hormônio que participa do metabolismo do cálcio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

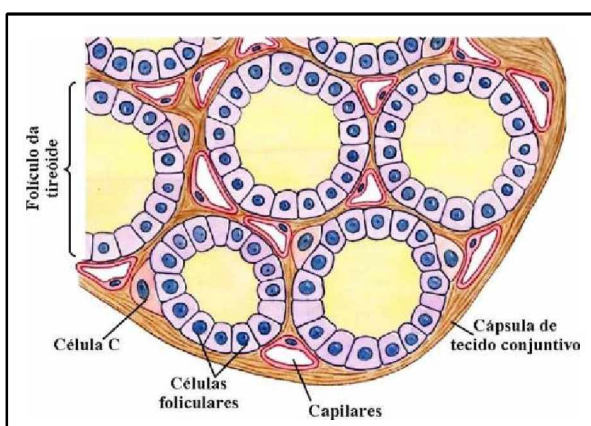


Figura 2 – Representação da histologia da glândula tireóide
(fonte: <http://pt-br.aia1317.wikia.com>)

2.1.3. *Neoplasias*

Os tumores da tireoide compõem um grupo heterogêneo de neoplasias, de características clínicas e patológicas distintas, que se originam das células foliculares, das células C, ou de outros tipos celulares, cujo comportamento e prognóstico variam de acordo com o tipo de neoplasia (DELELLIS, 2006).

As neoplasias malignas da tireoide são relativamente comuns, com incidência anual estimada em 0,5 a 10 novos casos por 100.000 pessoas, dependendo da região. Nos Estados Unidos, a *American Cancer Society* estimou que 60.220 novos casos de câncer de tireoide seriam

diagnosticados durante o ano de 2013 e que aproximadamente 1.850 pessoas morreriam dessa doença naquele ano (SIEGEL, 2013). No Brasil, estima-se 9.200 casos novos desse tipo de câncer para 2014, sendo que 87,5% atingirão mulheres (BRASIL, 2013).

A maioria dos casos é diagnosticada em adultos, entre 20 e 50 anos de idade, com relação de 4 a 5 mulheres para cada homem (DELELLIS, 2006). Sua incidência tem aumentado, no decorrer dos últimos anos, em ritmo maior do que qualquer outra malignidade, em ambos os sexos e em todas as origens étnicas (RIES, 2005). Embora o aumento da incidência possa refletir a detecção precoce da doença subclínica (ou seja, pequenos tumores), análise do banco de dados SEER do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos mostrou aumento nas taxas de câncer diferenciado da tireoide de todos os tamanhos, incluindo tumores maiores que 4 cm (DAVIES, 2006). Além disso, constatou-se que a taxa mortalidade estável do câncer de tireoide difere dos outros tumores sólidos em adultos, onde as taxas de mortalidade têm diminuído, nos últimos anos (SIEGEL, 2013).

A apresentação clínica mais frequente da neoplasia tireoidiana é de um nódulo palpável na tireoide descoberto pelo paciente ou por seu médico (FRATES, 2006). Não obstante, tem crescido o número de pacientes com nódulos não palpáveis, descobertos incidentalmente por exames de imagem não relacionados à tireoide. Em ambas as situações o diagnóstico é inferido após punção aspirativa com agulha fina (PAAF) seguida por exame citopatológico do material, que permanece sendo o procedimento de escolha para o diagnóstico pré-operatório (BONGIONANNI, 2012).

Em relação à etiologia do câncer papilífero da tireoide, o dado mais bem estabelecido é sua associação com a radiação ionizante (LIVOLSI 2011). Nos últimos 25 anos do século XX, com a crescente utilização de radioterapia para neoplasias, sobreviventes de câncer de vários órgãos tratados com essa terapia desenvolveram câncer de tireoide como uma nova neoplasia. (CHOW, 2009). Isso é atribuído, em parte, ao fato de que a radiação no pescoço danifica os folículos da tireoide e causam hipotireoidismo. A resposta a este declínio da função leva ao aumento da secreção de TSH. Especula-se que a estimulação do TSH sobre esse epitélio folicular danificado pela radiação possa levar a transformação neoplásica das células da tireoide (LIVOLSI, 2011).

Quanto aos variados tipos histológicos dos tumores de tireoide, a classificação atualmente adotada pela Organização Mundial da Saúde é a apresentada no Quadro 1 (DELELLIS, 2004).

Quadro 1 – Classificação dos tumores de tireoide, segundo a Organização Mundial da Saúde (DELELLIS, 2004).

Tumores do epitélio folicular ou metaplásico
Adenoma folicular (inclui células de “Hurthle”) Carcinoma folicular (inclui células de “Hurthle”) Minimamente invasivo Fracamente invasivo Carcinoma papilífero Carcinoma pouco diferenciado (inclui insular) Carcinoma de células escamosas e anaplásico (inclui carcinosarcoma) Carcinoma de células colunares Carcinoma mucoepidermóide Carcinoma mucoepidermóide esclerosante com eosinofilia Carcinoma mucinoso
Tumores com diferenciação de células C
Carcinoma medular
Tumores com diferenciação de células C e foliculares
Tumor de colisão: medular e folicular/papilífero Carcinoma parafolicular-folicular misto
Tumores com diferenciação tímica ou cisto branquial
Timoma ectópico Tumor epitelial fusiforme timo-símile (SETTLE) Carcinoma com elementos timo-símile (CASTLE) / tímico intratireoideo
Tumores de células linfóides
Linfomas Plasmocitomas
Tumores de paratireoide intratireoideos
Adenoma de paratireoide Carcinoma de paratireoide
Tumores mesenquimais e outros
Tumores mesenquimais benignos e malignos Paragangliomas Teratomas

O carcinoma papilífero é sem dúvida o tipo histológico mais comum, respondendo por 70% a 80% dos casos (SOARES, 2007), seguido pelo carcinoma folicular que responde por 15% dos casos, e então pelo carcinoma anaplásico que compõe entre 2 e 5% dos casos e provavelmente surge a partir de cânceres diferenciados (DELELLIS, 2004). O carcinoma medular, que se origina das células parafoliculares, representa cerca de 3% de todos os cânceres de tireoide

(NIKIFOROV, 2011). Outras doenças malignas da tireoide são muito raras. Embora o carcinoma papilífero seja neoplasia maligna mais comum da tireoide, é, por outro lado, a que mostra evolução mais lenta e indolente, com o melhor prognóstico por serem muito frequentemente curáveis (DELELLIS, 2006).

2.1.4. *Fatores prognósticos dos carcinomas diferenciados da tireoide*

A maioria dos pacientes com câncer papilar não morre de sua doença. Por exemplo, em uma série de pacientes com mediana de seguimento de 16 anos, a mortalidade relacionada ao câncer em pacientes sem metástases na apresentação foi de apenas 6% (MAZAFERRI, 1994). Certas características clínicas e patológicas pressagiam risco um pouco maior de recorrência do tumor e de mortalidade específica, como a idade, o tamanho, a invasão de tecidos, metástases e o tipo histológico (TUTTLE, 2008).

Pacientes diagnosticados com mais de 45 anos de idade possuem prognóstico significativamente pior do que aqueles mais jovens (ZAYDFUDIM, 2008; VOUTILAINEN, 2001).

Carcinomas papilíferos diagnosticados com menos de 1cm mostram excelente prognóstico, enquanto tumores maiores que 4cm estão associados a pior prognóstico. Para carcinomas foliculares o pior prognóstico ocorre para tumores maiores que 3,5cm, e para carcinomas medulares maiores que 1cm (HAY, 2008).

O comprometimento da cápsula tireoidiana e extravasamento da neoplasia para os tecidos moles circunjacentes aumenta o risco de morte em até cinco vezes, e se associa também a maiores índices de recidiva local, regional e a distância, além de impacto na sobrevida (SOBRINHO, 2007).

A sobrevida em pacientes com metástases distantes na apresentação inicial é variável. Entre os pacientes com pequenas metástases pulmonares, mas sem outras metástases fora do pescoço, a taxa de sobrevivência de 10 anos é 30 a 50%; taxas de sobrevivência ainda maiores foram relatadas em pacientes cujas metástases pulmonares foram detectadas apenas por cintilografia. Por outro lado, a sobrevida mediana de pacientes com metástases cerebrais é cerca de apenas um ano (CASARA, 1993).

Finalmente, dentre os carcinomas de tireoide, como na maioria dos cânceres, os tipos histológicos menos diferenciados apresentam pior prognóstico. Em termos de resultados de tratamento, a neoplasia tireoidiana poderia ser assim distribuída daqueles com melhor para aqueles com pior chance de cura: carcinoma papilífero, carcinoma folicular, carcinoma de células de Hürthle, carcinoma medular, carcinoma pouco diferenciado e carcinoma anaplásico (SOBRINHO, 2007).

2.1.5 Fatores genéticos envolvidos na neoplasia tireoidiana

Anormalidades evidenciadas por estudos citogenéticos e moleculares, demonstram uma série de genes envolvidos na tumorigênese da glândula tireoide, sugerindo uma “assinatura molecular” específica do tumor, que pode ser associada com resultados clinicamente significativos. Dados clínicos, epidemiológicos e patológicos sustentam o conceito de “um processo de múltiplos passos” na progressão e desdiferenciação da neoplasia tireoidiana (NIKIFOROV e NIKIFOROVA, 2011), com perda gradual do padrão de crescimento papilar e folicular, e surgimento de um padrão de crescimento sólido, com um aumento das mitoses, necrose e pleomorfismo nuclear frequentemente presente nos carcinomas agressivos da tireoide. Hoje é possível afirmar que o adenoma folicular é um tumor benigno que pode servir como precursor das neoplasias malignas da tireóide (NIKIFOROV, 2011)

Durante a última década pudemos testemunhar uma explosão de estudos genéticos que gerou uma grande massa de informações sobre as alterações moleculares envolvidas nos carcinomas da tireoide. Este novo conhecimento tem proporcionado novas descobertas a respeito da etiologia do câncer de tireoide, além de oferecer novas ferramentas diagnósticas e marcadores de prognóstico, permitindo uma abordagem melhor e mais personalizada dos pacientes com esta neoplasia (NIKIFOROV e NIKIFOROVA, 2011). Genes críticos são frequentemente mutados por dois mecanismos distintos: mutações pontuais (*BRAF* e *RAS*) ou rearranjos cromossômicos (*RET/PTC*, *TRK* e *PAX8-PPAR γ*) (NIKIFOROV, 2011). A maior parte das mutações nessas neoplasias envolve as vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT, afetando seus transmissores intracelulares de sinal (*BRAF* e *RAS*) o que é crucial na iniciação da tumorigênese (NIKIFOROV e NIKIFOROVA, 2011).

Rearranjo RET/PTC

O proto-oncogene RET é um exon-gene 21 localizado no braço proximal longo do cromossomo 10, que codifica um receptor tirosina-quinase envolvido na regulação do crescimento, sobrevivência, diferenciação e migração de células originárias da crista neural, e que não é normalmente expresso na célula folicular (VIGLIETTO, 1995). Um rearranjo do gene *RET*, conhecido como rearranjo RET/PTC ocorre no carcinoma papilífero da tireoide. Muito embora mais de 10 tipos de rearranjos tenham sido descritos, os rearranjos *RET/PTC1*, *RET/PTC2* e *RET/PTC3* são os mais encontrados no carcinoma papilífero (SANTORO, 2000). Expressão de proteínas quiméricas do RET/PTC resulta em uma ativação constitutiva, independente do ligante no receptor tirosina-quinase RET em células do câncer papilar, levando a uma estimulação crônica da via MAPK e tumorigênese na célula tireoidiana (PATEL, 2006).

Evidências apoiam a crença de que rearranjos RET/PTC representam alterações genéticas precoces, levando ao desenvolvimento carcinoma papilífero da tireoide (NIKIFOROVA, 2003). No entanto, os carcinomas positivos para rearranjos do RET/PTC apresentam um potencial relativamente baixo de progressão para o carcinoma pobremente diferenciado ou o anaplásico (SANTORO, 2002).

NTRK1

Rearranjos cromossômicos envolvendo outro gene de receptor tirosina-quinase, NTRK1, também ocorrem em carcinomas papilíferos de tireóide, embora com uma prevalência significativamente menor do que rearranjos RET/PTC. Esses rearranjos, conhecidos como TRK, têm sido relatados em até 10 a 15% de carcinomas papilares da tireoide (NIKIFOROV, 2011).

Mutação do *RAS*

Três genes *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS*), sintetizam uma família de proteínas que desempenham um papel importante na tumorigênese: as proteínas RAS. São proteínas G que se situam na superfície interna da membrana celular, cuja função é transmitir sinais provenientes de receptores tirosina-quinase da membrana para uma cascata de proteínas quinases mitogênico-ativadas (MAPK) (PATEL, 2006). Tais proteínas existem em duas

formas diferentes: uma forma inativa que é vinculada à GDP e uma forma ativa que atua com a GTPase (BARBACID, 1987). A via MAPK ativa a transcrição dos genes-alvo envolvidos na proliferação celular, sobrevivência e apoptose. A ativação oncogênica da RAS resulta de mutações pontuais, que afetam o domínio de ligação da GTP ou o domínio da GTPase, o que mantém a proteína no estado ativado e, portanto, resultando em estimulação crônica dos alvos subjacentes, instabilidade genômica, mutações adicionais e transformação maligna (FINNEY e BISHOP, 1993).

As mutações RAS estão entre as mais comumente encontradas em células transformadas. Foram identificadas nos genes RAS dos tumores benignos e malignos da tireoide, sendo mais comuns no carcinoma folicular, no carcinoma pouco diferenciado e nos anaplásicos; e menos frequentemente nos carcinomas papilíferos (MEINKOTH, 2004). O papel da RAS oncogênica na progressão do tumor de tireóide ainda não é claro. Alguns estudos têm demonstrado uma prevalência semelhante de mutações RAS em neoplasias benignas e malignas da tireóide, sugerindo que a ativação da RAS pode representar um evento inicial na tumorigênese (NAMBA, 1990). Outros estudos demonstraram que mutações específicas (codon 61 da N-RAS), estão envolvidas com a progressão do tumor e com o comportamento clínico agressivo, sugerindo que a presença dessas mutações, pode prever um resultado ruim para o carcinoma bem diferenciado (GARCIA-ROSTAN, 2003). Além disso, foi descoberto que carcinomas mais indiferenciados frequentemente abrigam várias mutações de RAS, que provavelmente representam um evento intermediário na progressão do carcinoma de tireoide (NIKIFOROV, 2011).

Mutações no *BRAF*

Existem três isoformas da serina-treonina quinases RAF em células de mamíferos: ARAF, BRAF e CRAF ou RAF-1. A isoforma BRAF é a predominante em células foliculares da tireoide (XING, 2005). Como no RET/PTC e no RAS, muitas alterações genéticas no carcinoma da tireoide ativam a via de sinalização celular MAPK. Quando constitutivamente ativada, essa via é tumorigênica (PEYSSONNAUX e EYCHENE, 2001). Dentre as três isoformas das quinases RAF, a BRAF é a mais potente ativadora dessa via e, sua forma mutada se apresenta como o oncogene mais comum identificado nas formas esporádicas do carcinoma papilar (PATEL, 2006). A alta frequência e especificidade da mutação do *BRAF*

(V600E) sugere que essa mutação tem papel fundamental na iniciação da tumorigênese no carcinoma papilífero.

Os carcinomas papilíferos com essa mutação apresentam um fenótipo e um comportamento biológico distinto dos demais sem essa mutação: é mais presente em idade avançada, usualmente com extensão extratireoidiana, índice de recorrência locorregional aumentada e com menor resposta à radio-iodoterapia (RIESCO-EIZAGUIRRE, 2006). Tais características o tornam mais agressivo e com pior prognóstico que os carcinomas sem essa mutação.

PAX8-PPAR γ

O gene *PAX8* codifica um fator essencial para a gênese das linhagens de células foliculares da tireoide e regulação da expressão de genes específicos. O receptor γ de peroxissoma proliferador ativado (peroxisome proliferator-activated receptor γ – PPAR γ) é um membro da superfamília de receptores nucleares de hormônio que inclui receptores do hormônio da tireoide, ácido retinóico, andrógeno e estrógeno (TALLINI, 2002). Um rearranjo leva a uma fusão desses genes através de exons específicos, muito embora o mecanismo exato pelo qual este rearranjo produz um fenótipo cancerígeno ainda não é totalmente compreendido. Parece que a proteína quimérica PAX8-PPAR γ inativa o *PPAR γ* selvagem, que é considerado um supressor de tumor (YING, 2003).

Como com as mutações *RAS*, o rearranjo PAX8-PPAR γ também se mostrou envolvido no desenvolvimento do carcinoma folicular de tireoide e na variante folicular do carcinoma papilífero, onde ocorre em cerca de 33% de todos os tumores. O rearranjo também ocorre em adenomas foliculares (MARQUES, 2002).

2.2. Modificações globais de histonas

A expressão gênica pode ser modificada por alterações epigenéticas. Tais alterações se caracterizam por não envolverem mudanças na sequência nucleotídica do DNA, mas podem ser transmitidas às células filhas na divisão celular, podendo persistir por gerações (CATALANO, 2012; HERCEG e MURR, 2011). Dentre os diversos tipos de alterações epigenéticas, destacam-se as modificações globais de histonas, que interferem na compactação do DNA.

Em todos os eucariontes, o DNA está compactado na forma de cromatina, termo que designa toda a porção do núcleo que se cora e é visível ao microscópio de luz (do grego *croma* – cor) (ANDRADE e JORDÃO, 2011). Tradicionalmente, a cromatina era vista como necessária para “embalar” todo o comprimento do DNA em um núcleo com diâmetro médio de 10µm (em humanos), sendo essa a sua principal função. Em abordagens mais atuais, verificou-se que a organização da cromatina varia de acordo com a fase do ciclo celular e com o seu grau de atividade. Mais importante, a própria cromatina representa um nível adicional de regulação para todos os processos metabólicos próprios do DNA (replicação, reparação e expressão gênica), compondo então um mecanismo epigenético em que as histonas tem papel fundamental (SANTOS-ROSA e CALDAS, 2005).

2.2.1. As histonas

A cromatina é composta por DNA e por proteínas básicas chamadas histonas. Junto a essas proteínas, o DNA se organiza em unidades bem definidas, denominadas nucleossomos. Existem ainda, em menor quantidade, outras proteínas não-histônicas na cromatina, com funções específicas na estrutura e na regulação gênica (ANDRADE e JORDÃO, 2011). Cada nucleossomo é composto por cerca de 200 pares de bases nucleotídicas do DNA. Em torno de 150 pares de bases estão enoveladas em aproximadamente 1,7 voltas num octâmero de histonas, que constitui o centro do nucleossomo; os outros 50 pares de bases (número que pode variar de 10 a 90 pb) estão num segmento do DNA que une um centro do nucleossomo ao outro, por isso tal região é chamada de DNA de ligação (BHASIN, 2006).

As histonas são encontradas em todas as células eucariontes. São proteínas pequenas, com peso molecular entre 11 e 23 kDa e compostas de 102 a 220 aminoácidos, muito dos quais básicos (arginina e lisina). Existem cinco tipos (grupos) de histonas, classificadas de acordo com seu teor de lisina e, ou, arginina (VIÉGAS, 2008):

- H1 – ricas em lisinas,
- H2A e H2B – moderadamente ricas em lisinas,
- H3 e H4 – ricas em argininas.

As histonas H1 são as maiores, com 220 aminoácidos e 23 kDa de peso molecular. São compostas por uma porção globular, situada entre duas longas cadeias filamentosas N e C-

terminais, e são as histonas menos conservadas evolutivamente. Atualmente entende-se que a histona H1 não participa do centro do nucleossomo, mas tem papel importante na compactação da cromatina na medida em que se associa ao DNA de ligação que chega e deixa o centro do nucleossomo, causa um entrelaçamento entre esses segmentos, fazendo com que assumam uma conformação em zigue-zague (Figuras 1 e 3). Por isso, são consideradas histonas de ligação (ANDRADE e JORDÃO, 2011).

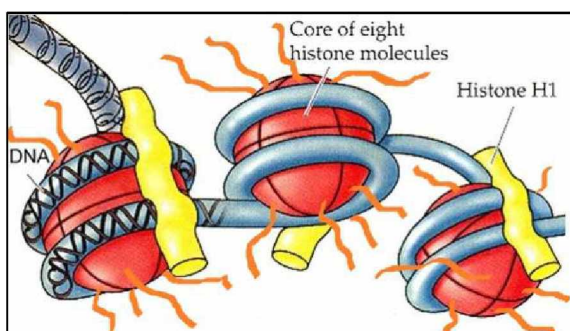


Figura 3 - Estrutura das histonas do núcleo octamérico e histonas de ligação com o DNA (fonte: <http://goo.gl/VpP1b8>, modificada: acrescidas caudas N-terminais).

As histonas H2A, H2B, H3 e H4 pertencem ao grupo das histonas do núcleo octamérico. São menores que H1 e partilham de uma mesma estrutura molecular, com as cadeias polipeptídicas dispostas em três sequências de α -hélices, conectadas por duas sequências filamentosas, além de um longo segmento N-terminal rico em aminoácidos básicos, especialmente lisina e arginina. As histonas H3 e H4 têm praticamente a mesma sequência de aminoácidos em todos os eucariontes, o que demonstra uma conservação de suas funções durante a evolução das espécies (ANDRADE e JORDÃO, 2011).

Como mostrado na **Figura 2**, cada octâmero de histonas consiste de duas cópias de H2A, H2B, H3 e H4. As histonas H3 e H4 formam um tetrâmero central, como o recheio de um sanduiche, enquanto as histonas H2A e H2B formam dois dímeros de cada lado do tetrâmero. As cadeias N-terminais dessas histonas estendem-se para fora do nucleossomo e estão expostas a modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação, fosforilação, entre outras (CHERVONA e COSTA, 2012).

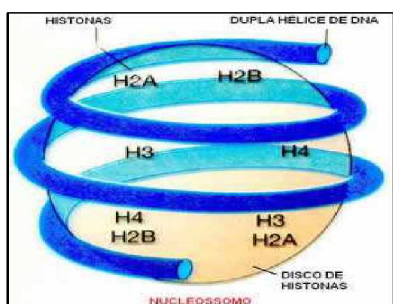


Figura 4 – Esquema da disposição das histonas e do DNA no centro do nucleossomo (Fonte: <http://goo.gl/yhy3OI>).

Ao longo do ciclo celular, o DNA aumenta gradativamente seu enovelamento e compactação, culminando com a compactação total dos cromossomos durante a metáfase. O primeiro nível de compactação é representado por uma estrutura conhecida como “colar de contas”, onde cada conta é composta por um nucleossomo, que por sua vez estão espaçados a cada 10nm, como mostrado nas Figuras 3 e 4. Por isso, esse primeiro nível de compactação é conhecido como fibra de 10nm (ALBERTS, 2008).

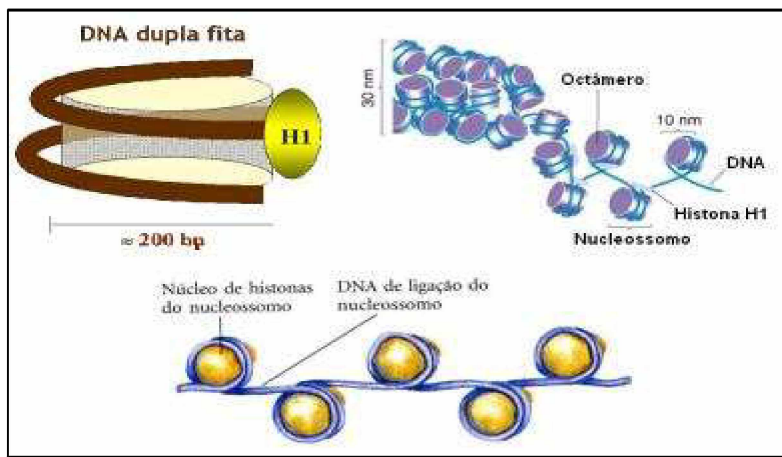


Figura 5 – Compactação da cromatina na fibra de 10nm (Fonte: <http://goo.gl/bZ21kh>).

O segundo nível de compactação, mostrado na Figura 4, é representado pela fibra de 30nm. Forma-se com a associação da histona H1 ao DNA de ligação, causando um entrelaçamento entre este e o centro do nucleossomo, originando uma estrutura em zigue-zague de 30nm que é 100 vezes mais compactada que o nível anterior e é o constituinte básico da cromatina interfásica, assim como dos cromossomos mitóticos e meióticos (ALBERTS, 2008)

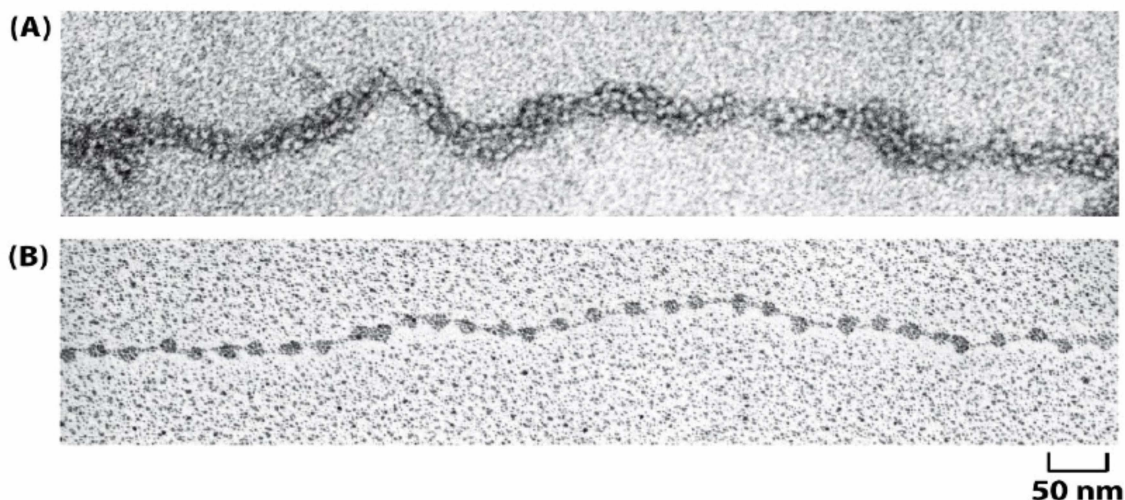


Figura 6 – Cromatina interfásica à microscopia eletrônica: (A) fibra de 30nm, (B) fibra de 10nm – “colar de contas”. (Fonte: ALBERTS, 2008)

Níveis ainda maiores de compactação ocorrem na organização estrutural da cromatina, pois a compactação final de um cromossomo é 10000 vezes maior que a de sua estrutura primária; no entanto, pouco se sabe sobre a organização desses níveis. Ao que parece, envolvem proteínas não-histônicas, bem como as histonas H1 e H3, de forma dependente da fosforilação de ambas durante a prófase (ANDRADE e JORDÃO, 2011).

Fora do ciclo celular, a compactação da cromatina é variável. A eucromatina é sua apresentação menos compactada, com amplas regiões abertas (não compactadas), ricas em genes e transcritionalmente mais ativas. Tipicamente, histonas dentro da eucromatina são altamente acetiladas e a histona H3 apresenta-se metilada nas lisinas 4 e 36. Em contraste, a heterocromatina é a forma compactada da cromatina interfásica, e constitui de 15 a 25% da cromatina dos mamíferos; apresenta regiões com baixa densidade de genes e menos ativas do ponto de vista transcricional. As histonas em regiões de heterocromatina mostram baixos níveis de acetilação, em contraste com altos níveis de metilação nas lisinas 9 e 36 da histona H3 (XU e PRICE 2011). Portanto, fica clara a associação entre modificações (acetilação e metilação) das histonas e o remodelamento da cromatina, com influência relevante na transcrição gênica, mas também na replicação e reparo do genoma (XU e PRICE, 2011; SANTOS-ROSA e CALDAS, 2005).

2.2.2. Modificação de Histonas

Diversas alterações pós-traducionais podem acometer as histonas H1 e as do tipo *core*, tanto em seus domínios centrais quanto nas extremidades N e C-terminais (COHEN, 2011; JAYANI, 2010). De fato, mais de uma dezena de modificações já foram descritas em histonas, das quais pelo menos oito estão bem caracterizadas: **acetilação, metilação, deiminação, fosforilação, ubiquitinação, sumoylação, ribosilação de ADP, e isomerização de prolina** (HERCEG e MURR, 2011). Pelo menos 80 sítios diferentes de modificação de histonas já foram reportados (COHEN, 2011). Por seu número e variação, permitem grande flexibilidade na regulação da dinâmica da cromatina (Figura 5).

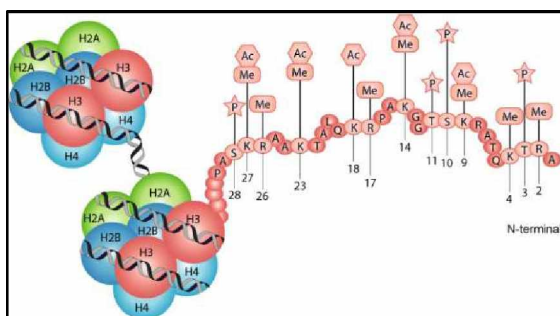


Figura7 – Representação da cauda N-terminal de histona, exibindo modificações pós-traducionais em resíduos específicos: Ac - acetilação, Me - metilação e P - fosforilação (Fonte: <http://goo.gl/xEexjt>).

Dois mecanismos são usualmente utilizados para explicar como tais modificações afetam a cromatina: 1) interferem nas interações nucleossomo-nucleossomo ou DNA-nucleossomo, através da adição de elementos ou alterando as cargas da histona; 2) podem representar um sítio de recrutamento de proteínas específicas, favorecendo diferentes respostas celulares (HASSAN, 2002; COHEN, 2011). Além disso, acredita-se que poderiam formar um "código de histonas", em que modificações diferentes, mas interdependentes, resultariam em respostas celulares distintas (STRAHL e ALLIS 2000; COHEN, 2011). Como anteriormente mencionado, a acetilação e a metilação de histonas destacam-se entre as modificações pós-traducionais pela sua associação ao estado de compactação do DNA.

A adição ou remoção dessas modificações pós-traducionais nas caudas N-terminais de histona é bastante dinâmica e são catalisadas por diferentes enzimas, muitas vezes designadas como “escritoras” ou “apagadoras” dessas marcas reversíveis (CHERVONA e COSTA, 2012).

A acetilação de histonas ocorre pela transferência de um grupo acetila proveniente de moléculas de acetil-CoA para resíduos de lisina na cadeia N-terminal das histonas H2A, H2B, H3 e H4, reação essa catalisada por acetiltransferases de histonas, mais frequentemente designadas como histonas-acetiltransferases ou HATs (COHEN, 2011). A atividade das HATs pode levar à hiperacetilação das histonas, o que é considerado uma marca de regiões transcricionalmente ativas, podendo também afetar a replicação e o reparo de DNA (CHERVONA e COSTA, 2012). Tal associação parece ser explicada pela neutralização da carga elétrica da histona com sua acetilação, evento que enfraquece a interação DNA-histona e que pode, portanto, relaxar a cromatina e favorecer o acesso da maquinaria de transcrição (Figura 6). A acetilação é um processo reversível, o que é catalisado pelas enzimas desacetilase de histonas ou HDACs.

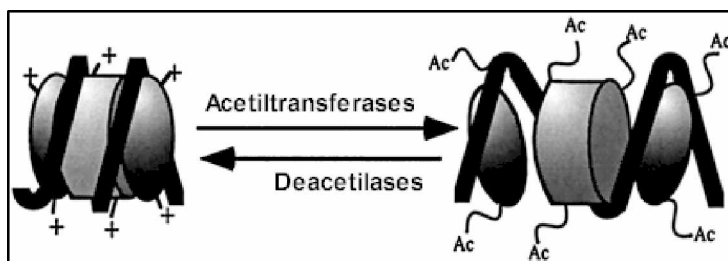


Figura 8 – Efeito da acetilação e desacetilação de histonas no nucleossomo
(Fonte: <http://goo.gl/92uGqt>).

A metilação de histonas ocorre pela adição covalente de um grupo metil proveniente de S-adenosilmetionina (SAM) a átomos de hidrogênio da cadeia lateral (N-terminal) dos resíduos de arginina e lisina. Esta reação é catalisada pelas histonas-metiltransferases ou HMTs.

Argininas podem ser mono ou dimetiladas; lisinas podem ser mono, di ou trimetiladas (KOUZARIDES, 2007).

Quadro 2 – Associações descritas entre metilações de histonas e a transcrição gênica.

Modificação de histonas*	Efeito sobre a transcrição gênica	Referência
H3K4me, H3K4me2, H3K4me3 (*)	Iniciação e prolongamento	SANTOS-ROSA e CALDAS, 2005
H3K4me3, H3K36me3 (**)	Iniciação	IZZO, 2010
H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3(***)	Silenciamento	IZZO, 2010
H3K79me (****)	Iniciação e prolongamento	STEGER, 2008

(*) - metilação, dimetilação ou trimetilação na lisina 4 da histona 3; (**) - trimetilação nas lisinas 4 e 36 da histona 3; (***) Trimetilação nas lisinas 9 e 27 da histona 3 e na lisina 20 da histona 4; (****) – metilação da lisina 79 da histona 3.

Em contraste com a acetilação, a metilação em uma cadeia lateral não altera sua carga e, portanto, é improvável que a metilação module diretamente interações do nucleossomo necessárias para dobrar de cromatina (IZZO e SCHNEIDER, 2010). A metilação de histonas pode estar relacionada à ativação, prolongamento ou repressão da expressão gênica, conforme apresentado no Quadro 2. Este também é um processo reversível, situação em que atuam as enzimas histonas-desmetilases ou HDMs (COHEN, 2011).

2.2.3. Modificações de histonas e as neoplasias

O câncer tem sido reconhecido como uma doença multifacetada, na qual o início e a progressão são influenciados por uma série de fatores. Na década de 1990, o foco das pesquisas epigenéticas trouxe à luz as descobertas relacionadas às anormalidades na metilação do DNA (JONES e BAYLIN, 2002). Na última década, este foco foi ampliado pela investigação sobre o papel desempenhado pelas modificações pós-traducionais das histonas na regulação gênica, na carcinogênese e no prognóstico do câncer (BAYLIN e JONES, 2011). De fato, função alterada das enzimas modificadoras de histonas, ou mesmo modificações aberrantes em histonas, têm sido associadas a diversas neoplasias, tais como os expostos no Quadro 3 (CHERNOVA e COSTA, 2012).

A acetilação aberrante pode resultar de translocações nas histonas-acetiltransferases humanas, onde a proteína resultante exibe “ganho de função” por desregulação na atividade de HAT ou direcionando a acetilação de lisina para novos substratos. Algumas dessas translocações envolvendo os genes *MORF*, *CBP* ou *p300*, encontram-se associadas com a leucemia mielóide aguda e a síndrome mielodisplásica relacionada à terapia (COHEN, 2011). A alta ocorrência de proteínas HAT entre as translocações leucêmicas, realçam a importância do estreito equilíbrio da acetilação da histona na execução do programa hematopoiético (SANTOS-ROSA e CALDAS, 2005). Além das translocações, mutações de algumas HATs estão associadas com o desenvolvimento de câncer. De fato, essas mutações têm sido detectadas em cânceres humanos, em particular com perda da função, como nos cânceres colorretal, estômago, mama, ovário, pulmão e pâncreas (BRYAN, 2002). Neste sentido, elas agiriam como supressores de tumor.

Quadro 3 - Estudos recentes relacionando modificações de histonas e que mostraram relevância no prognóstico de neoplasias malignas (CHERVONA e COSTA, 2012)

Estudo	Neoplasia	Modificações de Histonas
Song et al, 2012	Pulmão	H3K9ac, H3K9me3, H4K16ac
Barlési et al, 2007	Pulmão	H3K9ac, H3K4me2
Van Den Broek et al, 2007	Pulmão	H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H3K4me2
Seligson et al. 2009	Pulmão	H3K4me2, H3K18ac
Seligson et al 2005	Próstata	H3K4me2, H3K18ac
Ellinger et al. 2010b	Próstata	H3K4me1, H3K9me2, H3K9me3, H3Ac, H4Ac
Behbahani et al. 2012	Próstata	H4K20me1, H4K20me2
Bianco-Miotto et al. 2010	Próstata	H3K4me2, H3K18ac
Ellinger et al. 2012	Próstata	H3K27me3
Elsheikh et al. 2009	Mama	H3K18ac, H4K12ac, H3K4me2, H4K20me3, H4R3me2, H4K16ac
Leszinski et al. 2012	Mama	H3K9me3, H4K20me3
Müller-Tidow et al. 2010	Leucemia	H3K9me3
Park et al. 2008	Estômago	H3K9me3
Zhang et al. 2009	Estômago	H3K27me3
Tzao et al. 2009	Esôfago	H3K18ac, H4R3me2, H3K27me3
I et al. 2010	Esôfago	H3K18ac, H4R3me2
Ellinger et al. 2010a	Rim	H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3
Rogenhofer et al. 2012a	Rim	H3K9me1
Rogenhofer et al. 2012b	Rim	H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3
He et al. 2012	Fígado	H3K4me3
Cai et al. 2011	Fígado	H3K27me3
Manuyakorn et al. 2010	Pâncreas	H3K4me2, H3K9me2, H3K18ac

A desacetilação de histonas resulta em uma diminuição da acessibilidade para os fatores de transcrição. As histonas-desacetilases (HDACs) estão envolvidas na regulação de um número bastante limitado de genes envolvidos na sobrevivência, diferenciação e crescimento celular, e

alguns efeitos foram mostrados na angiogênese e imunogenicidade (GRONBAEK, 2007). Há mais de um mecanismo pelo quais HDACs podem funcionar no desenvolvimento do câncer: por um lado, um aumento anormal na atividade HDAC pode resultar em inativação transcricional de genes supressores de tumor como *p53*; por outro lado, o supressor de tumor *Rb* requer a atividade de HDACs para exercer sua função; assim, mutações nesta classe de desacetilases podem contribuir para a o câncer (COHEN, 2011). Além do mais, o resultado mais comum da inibição da atividade HDAC é desencadear a diferenciação, parada de crescimento, e/ou apoptose de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, sendo que estas são as bases para o desenvolvimento de inibidores de HDACs como drogas anticâncer. Neste momento, HDACs são consideradas alguns dos alvos novos mais promissores para terapia epigenética anticâncer (GRONBAEK, 2007).

Ainda não está claro se o papel demonstrado pelas HDACs é causa ou consequência da tumorigênese, pois sua desregulação pode ter um efeito secundário à natureza altamente proliferativa dos tumores sólidos e das metástases. O fato é que a desacetilação de histonas está ligada a oncogênese e que, uma regulação precisa e acurada da mesma é necessária para prevenir o desenvolvimento e a progressão do câncer (VARAMBALLY, 2008).

A metilação de histonas está envolvida em múltiplos processos celulares de desenvolvimento e diferenciação, pluripotência e manutenção da integridade genômica. Por isso não é de se surpreender que muitas metiltransferases de histonas estejam associadas ao câncer, embora esse envolvimento seja muitas vezes contraditório (HERCEG e MURR, 2011). As consequências funcionais da metilação de histonas dependem do número de grupos metil, do resíduo metilado e sua localização dentro da cauda de histona (COHEN, 2011).

Por exemplo, a histona 3 di e trimetilada na lisina 4 da (H3K4me2 e H3K4me3) e histona 3 metilada na lisina 9 da (H3K9me) estão associadas com cromatina aberta e expressão de gene ativo; já a histona 3 di e trimetilada na lisina 27 (H3K27me2 e H3K27me3) e a histona 3 di e trimetilada na lisina 9 da (H3K9me2 e H3K9me3) são associadas com cromatina inativa e repressão da expressão gênica (SCHNEIDER e GROSSCHEDL, 2007). Além disso, algumas modificações, tais como a histona 3 metilada lisina 4 da (H3K4me) e a histona 3 acetilada na lisina 27 (H3K27ac) encontram-se nos elementos potencializadores de genes e podem influenciar o expressão gênica mesmo a grandes distâncias do gene. Potencializadores ativos estão aumentados com H3K27ac, enquanto aqueles que ostentam apenas H3K4me estão prontos para ativação em resposta a um estímulo (CREYGHTON, 2010).

Um exemplo em neoplasia é encontrado em uma das metiltransferases de histonas mais estudadas envolvidas na oncogênese, a EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), que é reconhecida como uma repressora transcricional conservada evolutivamente, que di e trimetila especificamente os resíduos H3K27. Isso afeta muitos processos celulares, como apoptose, proliferação, diferenciação e controle do ciclo celular. Atualmente, numerosas evidências sugerem que a desregulação dessa enzima no câncer, promove sua progressão (BRACKEN, 2003). Sua superexpressão foi encontrada em cânceres agressivos de mama, pulmão, fígado, nasofaringe, colo e próstata, dentre outros carcinomas. Essa superexpressão seria a responsável pela repressão de vários genes supressores de tumor, tais como: *p16*, *E-caderina*, *DAB2ip*, *RUNX3*, *BRCA1* e *receptor adrenérgico β 2* (COHEN, 2011). Contraditoriamente, mutações inativadoras da EZH2, foram demonstradas em malignidades mieloides, sugerindo que essa metiltransferase também age como um supressor de tumor, ou seja, sua inativação pode promover outras malignidades (ERNST, 2010).

Outros exemplos, a metilação da H3K9 (mono, di ou trimetilação) pode induzir distintos estados da cromatina, sendo que a H3K9me3 se relaciona com o silenciamento transcricional e age como uma plataforma de ligação para a proteína 1 da heterocromatina (HP1). As enzimas que trimetilam a H3K9 são a SUV39H1 e SUV39H2 têm papel fundamental no estabelecimento da heterocromatina constitutiva (GARCÍA-CAO, 2004). Ao que parece, a metilação da H3K9 protege as células da instabilidade genômica, e sua ausência pode resultar em tumorigênese. A HMT G9a é classificada como uma H3K9 metiltransferase, mas recentemente demonstrou-se que ela contribui para a metilação da H3K27 (WU, 2011) e que encontra-se suprarregulada no câncer de pulmão agressivo e sua expressão está relacionada ao mal prognóstico (CHEN, 2010).

Concluindo, muito embora os estudos atuais não sejam suficientes para validar as modificações de histonas como biomarcadores prognósticos de câncer, a literatura existente fornece um relato convincente de seu potencial (CHERVONA e COSTA, 2012). Ademais, além de ser potenciais biomarcadores moleculares da doença, as modificações pós-traducionais de histonas também podem servir como alvos potenciais de terapias epigenéticas do câncer, uma vez que são processos potencialmente reversíveis e catalisados por enzimas específicas. Por isso, o papel de modificação pós-traducional histona na etiologia e no comportamento do câncer exige mais investigação e exploração.

2.3. Alterações epigenéticas e o carcinoma da tireoide

Atualmente, estão disponíveis poucas informações sobre as modificações das histonas em tumores de tireoide, em especial sobre a relação entre tais modificações e o comportamento das neoplasias. Dentre os poucos estudos publicados, os primeiros já mostravam que modificações de histonas, em especial a acetilação e a desacetilação, desempenham papel importante na regulação de genes específicos na carcinogênese da tireoide (KITAZONO, 2001; MITSIADES, 2004).

Uma das características da célula tireoidiana é a capacidade de concentrar o iodo, a qual é inclusive utilizada no tratamento do carcinoma diferenciado da tireoide, através da radio-iodoterapia. Essa característica é conferida pela expressão do gene *NIS* (simportador de sódio/iodeto), e por outro lado é perdida na transição entre os tumores diferenciados para indiferenciados. Esta é inclusive uma das razões para a dificuldade de tratamento desses tumores, uma vez que o radio-iodo tanto é utilizado para o diagnóstico precoce, quanto para o tratamento de remanescentes do tumor e das metástases à distância. Num estudo recente (PUPPIN, 2005), demonstrou-se que inibidores de histona-desacetilases (HDAC) podem aumentar a expressão de *NIS* em linhagens de células de câncer de tireoide, de maneira independente do fator de transcrição. Outro estudo (KONDO, 2009) observou que modificações epigenéticas impactam na expressão do TTF-1 em carcinomas de tireoide, pois um subconjunto dessas células perde essa expressão. Por outro lado, agentes desmetilantes de DNA podem restaurar a expressão TTF-1 em células de carcinoma de tireoide. Isso abre a possibilidade de se usar o TTF-1 como alvo para a terapia de indução de diferenciação pelas modificações epigenéticas.

O grupo de BORBONE *et al* (2011) observou expressão elevada de EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) em carcinomas anaplásicos quando comparados a outros carcinomas de tireoide com diferentes graus de malignidade. Essa proteína, uma das metiltransferases de histonas envolvidas na oncogênese mais estudadas, é reconhecida como uma repressora transcricional conservada evolutivamente, que di e trimetila especificamente os resíduos H3K27.

Por fim, um estudo de PUPPIN *et al* (2011) mostrou que os níveis de lisinas acetiladas nas posições 9 e 14 da histona H3 (H3K9–K14ac) são significativamente mais elevados em adenomas foliculares (FA), carcinomas papilares (PTC), carcinomas foliculares da tiróide (FTC) e carcinomas indiferenciados (UC) do que em tecidos normais (NT). Dados semelhantes foram obtidos quando os níveis de lisina 18 acetilada da histona H3 (H3K18ac)

foram avaliados. A avaliação dos níveis de lisina 12 acetilada da histona H4 (H4K12ac) evidenciou que apenas o adenoma folicular mostrou níveis significativamente mais elevados em comparação com o tecido normal.

Esses estudos mostram que existe uma correlação entre as modificações de histonas e a neoplasia tireoidiana. No entanto a ciência está apenas começando a entender as diversas implicações dessas modificações. O caminho científico percorrido em outras neoplasias tornam os estudos ainda nascentes em neoplasia tireoidiana uma grande promessa, não só em termos de diagnóstico, mas também na terapêutica, se tomamos as modificações de histonas como potenciais alvos para inibição.

3 - OBJETIVOS



3 – OBJETIVOS

Nosso estudo visa avaliar o padrão de expressão e relevância biológica de modificações de histonas em tecidos de neoplasias tireoidianas e tireoide normal, através da imuno-histoquímica. Para o momento, objetivamos:

1. Comparar a reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac e H3K36me3 entre os diferentes tumores avaliados, bem como com amostras de tireoide não neoplásica, com a finalidade de esclarecer diferenças de comportamento biológico e favorecer o diagnóstico diferencial.
2. Comparar a reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac e H3K36me3 entre carcinomas papilíferos primários que não apresentaram metástases e carcinomas papilíferos primários metastatizantes, com a finalidade de esclarecer diferenças de comportamento biológico e identificar casos potencialmente mais agressivos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4 – MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo tem caráter retrospectivo e analítico, com amostra de conveniência. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia, conforme parecer de número 66983 do referido comitê (CEP/UFU - Anexo I).

4.1. Definição dos casos de interesse

Considerando os objetivos deste estudo, foram inicialmente definidos como casos de interesse aqueles pacientes com adenomas foliculares (neoplasia tireoidiana benigna) ou com carcinomas papilíferos (neoplasia maligna tireoidiana mais comum). Tendo em vista a investigação de possíveis associações com alterações histopatológicas ou de comportamento biológico, os carcinomas papilíferos foram ainda segregados em casos com histologia clássica ou de variante folicular, e ainda em primários não metastatizantes ou metastatizantes. Buscando ampliar a investigação sobre possível influência no desenvolvimento e comportamento dos diferentes tipos histológicos de neoplasias de tireoide, foram incluídos casos de carcinomas foliculares, carcinomas oncocíticos e de carcinomas medulares da tireoide (neoplasia maligna reconhecida pela maior agressividade quando comparada aos demais carcinomas tireoidianos). Entretanto, sua pouca frequência impediu a composição de grupos maiores dessas neoplasias.

O rastreamento inicial desses casos foi feito por consulta aos registros de tireoidectomias executadas pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (SCCP) do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU) nos anos de 2006 a 2011, correspondentes a 466 desses procedimentos.

Exceto por seis casos cujas amostras biológicas (blocos e lâminas histológicas) não estavam disponíveis, todos os casos foram revistos por uma patologista (Juliana Mota Pereira) com interesse específico em tumores de tireoide. Tal revisão teve como objetivo primário selecionar os casos mais representativos de cada um dos tumores previstos, segundo os critérios mais atuais relativos ao diagnóstico desses tumores (DELELLIS e WILLIAMS, 2004). Durante a revisão do material biológico disponível, foram excluídos os casos que apresentavam apenas um bloco em arquivo, artefatos técnicos extensos, necrose extensa, ou ainda que eram pequenos o suficiente para serem eventualmente consumidos durante as etapas laboratoriais do estudo. Ainda, mediante cálculo amostral que considerou diferença estimada como significativa entre os grupos de 4 pontos no índice combinado (ver adiante),

com desvio-padrão de 2 pontos, poder estatístico de 60% e nível alfa de 5%, estimou-se que o número de casos ideal para cada grupo deveria ser dez, com o software BioEstat 5.0. Ao final, a casuística selecionada para o presente estudo foi composta por noventa casos, conforme detalhado no Quadro 4.

Quadro 4 – Distribuição dos casos selecionados, segundo natureza das amostras biológicas, tipo histológico dos tumores e sexo dos pacientes.

Grupo	N	Homens	Mulheres
Tireoide normal	15	0	15
Adenomas foliculares	10	2	8
Neoplasias malignas	65	13	52
Carcinoma papilífero	52	10	42
<i>Clássico</i>	22	4	18
<i>Folicular</i>	20	4	16
<i>Metastatzante</i>	10	2	8
Carcinoma oncocítico	6	0	6
Carcinoma folicular	4	0	4
Carcinoma medular	3	3	0
Total	90	15	75

Após a revisão histológica, os casos selecionados tiveram suas informações demográficas (sexo e idade) e clínicas (localização do tumor e existência de metástases) extraídas de seus registros hospitalares.

4.2. Matrizes teciduais

Em cada caso selecionado, a patologista voltou às lâminas histológicas para eleger e marcar a área do tecido onde se encontravam as características mais típicas do diagnóstico e a menor quantidade de artefatos. A área assim demarcada foi utilizada como gabarito para a confecção de arranjos teciduais em matriz (TMA, *tissue microarray*), segundo descrito por NOCITO *et al* (2001) e exposto a seguir.

Dos casos selecionados, foram inicialmente extraídos cilindros de 0,6 mm de espessura dos respectivos blocos doadores, os quais foram transferidos para um bloco receptor. Nesse bloco, as amostras eram dispostas e identificadas segundo coordenadas (XY) alfanuméricas de

acordo com as linhas e colunas, tendo como referência amostras obtidas de fígado e miométrio dispostos em um dos cantos da matriz tecidual estabelecida.

Após depósito dos cilindros doadores no bloco receptor, o mesmo foi aquecido, visando à consolidação. Finalmente, foram obtidos cortes de 3µm de espessura de cada matriz, depositados em lâminas recobertas com 3-aminopropiltrietoxissilano, os quais foram submetidos a reações imuno-histoquímicas.

4.3. Imuno-histoquímica

Os cortes teciduais foram inicialmente desparafinados em xilol e hidratados em etanol acrescido de quantidades crescentes de água. Em seguida, procedeu-se à recuperação antigênica com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 1mM) tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), em ciclo de 15 minutos, na câmara eletrônica de pressão (*Decloaking Chamber NxGen – Biocare Medical, Concord, CA, USA*) a 110°C e pressão de 6 a 8PSI. Após resfriamento e lavagem em água destilada, foi então realizado o bloqueio da atividade de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, em três banhos de dez minutos cada, seguidos por lavagens em água destilada.

Na etapa seguinte, os cortes foram submetidos a três banhos de cinco minutos cada em solução-tampão TRIS-HCl (pH 7,4), e então incubados com solução bloqueadora de reações inespecíficas a base de caseína (*Background Sniper, Biocare Medical, Concord, CA, EUA*) por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, produzidos para detecção das seguintes modificações de histonas: H4K12ac (ABCAM, Cambridge, Reino Unido), diluído a 1:5.000, e H3K36me3 (ABCAM, Cambridge, Reino Unido), diluído a 1:10.000. A incubação foi realizada em câmara úmida, por duas horas, à temperatura ambiente. Após lavagem em TRIS-HCl, procedeu-se à amplificação da reação com sistema de estreptavidina-biotina-peroxidase (*Starr Trek, Biocare Medical, Concord, CA, USA*). Essa consistiu inicialmente na incubação com solução de anticorpo secundário biotilado, por 20 minutos, à temperatura ambiente, seguida por lavagem em solução de TRIS-HCl (2 banhos de 2 minutos cada), e incubação novamente por 10 minutos à temperatura ambiente em solução de estreptavidina conjugada a peroxidase.

Finalmente, após nova lavagem em TRIS-HCl, a reação foi revelada com a imersão dos cortes histológicos em solução aquosa de 3.3'tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e

peróxido de hidrogênio, por cinco minutos, com precipitação resultante do pigmento oxidado, seguido de banho em água corrente por outros cinco minutos para lavagem, levando-os por fim à contracoloração com hematoxilina de Harris e lavados em água corrente.

Após essa etapa, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanol (70%, 80%, 90% e duas vezes a 100%), diafanizados em dois banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e resina histológica (*Precision, Cralplast, China*).

Nos ensaios foram utilizados cortes histológicos de carcinomas de mama (utilizando uma lâmina contendo esse tecido para cada reação) para o controle positivo e negativo da H4K12ac e H3K36me3, sendo que, para o controle negativo houve a omissão do anticorpo primário.

4.4. Análise da imunomarcacão

As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas em microscópio de luz convencional (Leica DM750). Essa análise foi feita de forma independente por três avaliadores previamente calibrados, que em caso de discordância procedia uma nova avaliação, dessa vez em conjunto e até o consenso.

Foram utilizados como critérios de análise a presença ou não de reatividade, a compartimentalização da reação (nuclear isolada, ou citoplasmática e nuclear concomitantes), a intensidade de reação (IS) se fraca, moderada ou forte, e a proporção de células reativas (PPC) em seis intervalos. As classes e os valores atribuídos a cada uma delas são apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 – Parâmetros, classes e valores utilizados para avaliação das reações Imuno-histoquímicas (DETRE *et al.*, 1995).

Variáveis	Classes						
	0	1	2	3	4	5	6
Proporção de células positivas (PPC)	Ausência de células positivas	De 0-4% de células positivas	De 5-19% de células positivas	De 20-39% de células positivas	De 40-59% de células positivas	De 60-79% de células positivas	De 80-100% de células positivas
Intensidade de coloração (IS)	Ausência de marcação	Fraca	Moderada	Forte			

A partir dos valores obtidos nas análises de proporção (PPC) e intensidade (IS) de reação, foi determinado um índice composto, denominado *Quickscore* (QI), que seria o resultado da multiplicação dos valores segundo metodologia previamente descrita (DETRE *et al.*, 1995), como demonstrado abaixo. As classes com valores atribuídos ao QI são apresentados no Quadro 6:

$$\text{QI} = \text{PPC} \times \text{IS}$$

Quadro 6 – Classes de valores utilizados para avaliação quickscore (DETRE *et al.*, 1995).

QI	Classes												
	0	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	15	18

4.5. Tabulação de resultados e análise estatística

Optou-se pela categorização dos parâmetros de análise das reações na forma especificada abaixo:

- Compartimentalização: nuclear isolada *versus* nuclear e citoplasmática concomitantes.
- IS: reação ausente ou fraca *versus* moderada ou forte.
- PPC: ponto de corte correspondente ao valor médio do índice nos casos avaliados.
- QI: ponto de corte correspondente ao valor médio do índice nos casos avaliados.

Finalmente, foram feitas comparações probabilísticas para verificação de associações, utilizando-se o teste exato de Fisher, com nível de significância estabelecido em 0,05.

5 - RESULTADOS



5 - RESULTADOS

Os dados demográficos dos casos selecionados são mostrados na Tabela 1. Houve predomínio de mulheres nos pacientes relativos às amostras de tireoide normal, adenomas e carcinomas, na proporção geral de 5 para cada homem. A idade média foi de 42,9 anos, com a maior variação tendo sido observada para os carcinomas.

Tabela 1 – Dados demográficos dos pacientes avaliados, agregados conforme a natureza da amostra biológica avaliada.

	Proporção homem:mulher	Idade (anos)		
		Média	Variação	< 45 anos
Tireoide normal	0:15	41,2	18 – 68	66,7%
Adenomas	1:4	44,0	28 – 65	40,0%
Carcinomas	1:4	43,2	13 – 78	50,8%

Os dados individuais de cada caso, correspondentes à caracterização clínico-patológica e à reatividade imuno-histoquímica para detecção da acetilação da lisina 12 da histona 4 (H4K12ac) e a tri-metilação da lisina 36 da histona 3 (H3K36me3), são apresentados no Anexo II. Imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica das moléculas avaliadas são apresentadas nas figuras 7 e 8.

Figura 9 - Reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac em adenoma folicular (A), carcinoma papilífero (B), carcinoma oncocítico (C), carcinoma medular (D) e tecido normal (E) de tireoide. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 500 \times .

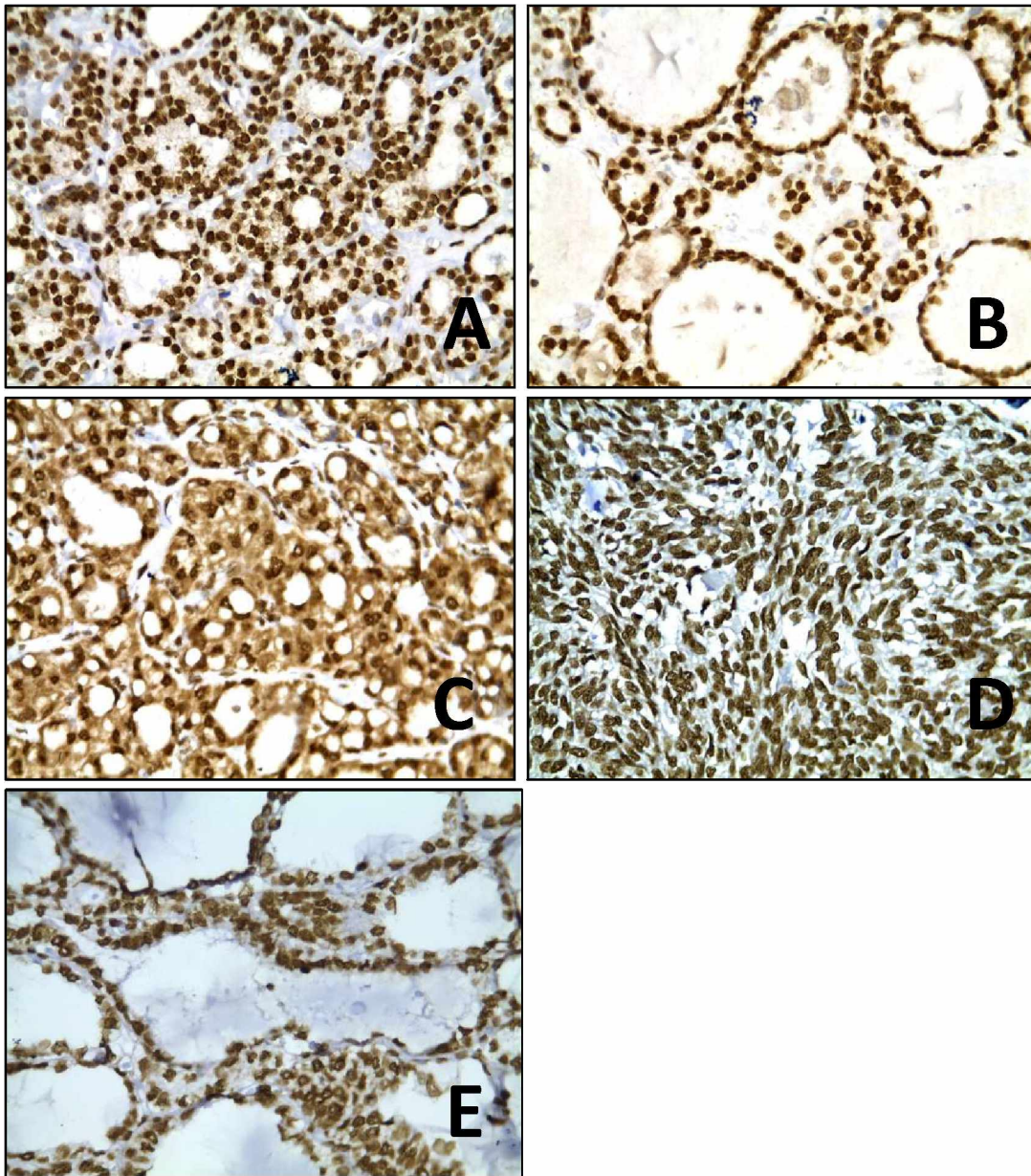
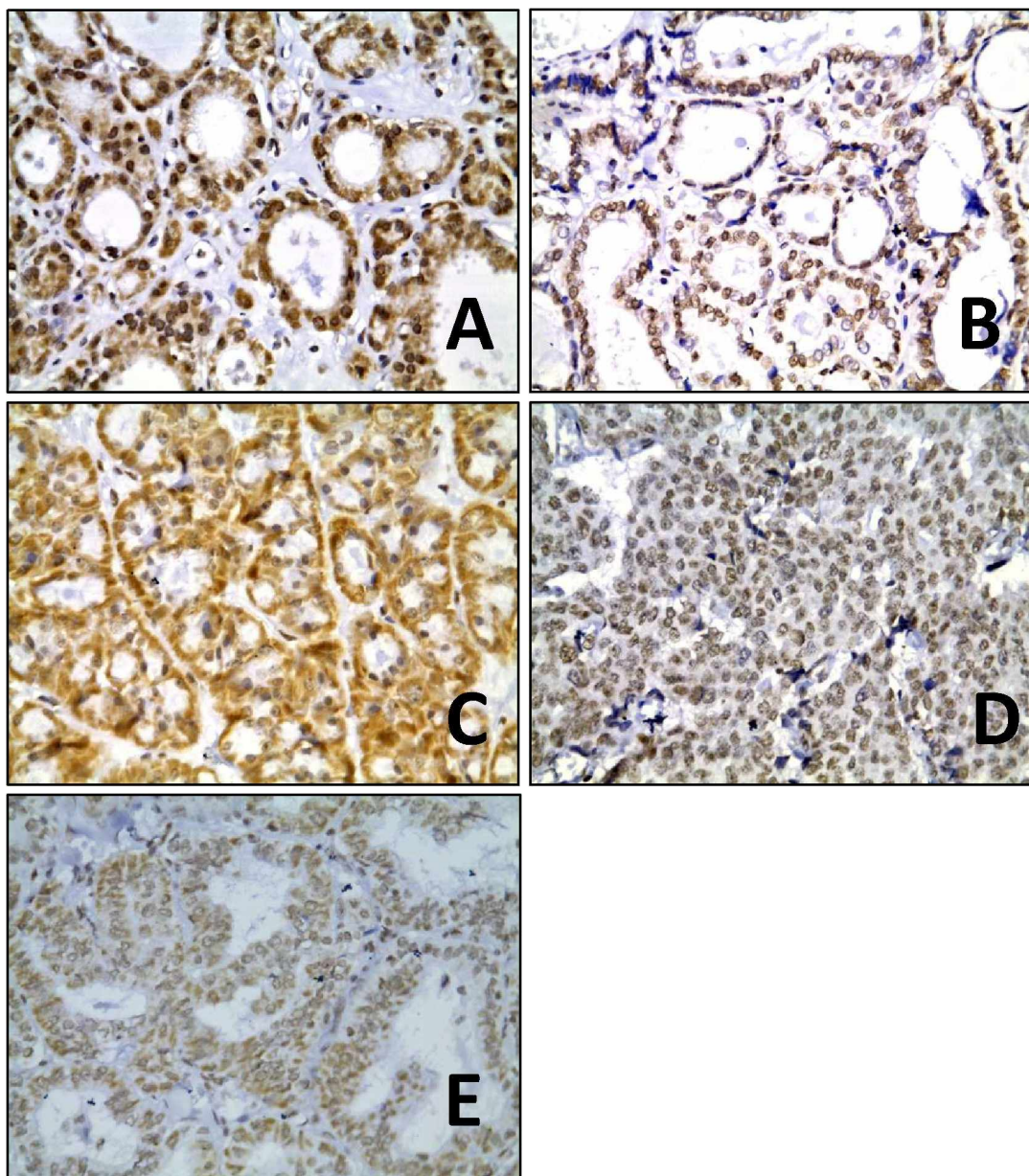


Figura 10 - Reatividade imuno-histoquímica para H3K36me3 em adenoma folicular (A), carcinoma papilífero (B), carcinoma oncocítico (C), carcinoma medular (D) e tecido normal (E) de tireoide. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 500 \times .



Em síntese, houve detecção de H4K12ac e H3K36me3 em todos os casos avaliados, exceto para dois casos (um carcinoma papilífero clássico, outro de carcinoma papilífero da variante folicular) em relação a H3K36me3.

Larga maioria das amostras apresentou reatividade apenas nuclear, conforme mostrado na Tabela 2. A exceção ocorreu, para ambas as moléculas avaliadas, com os carcinomas oncocíticos. De fato, foi detectada associação entre reatividade citoplasmática e carcinomas

oncocíticos quando comparados aos demais carcinomas, conforme mostrado nos Gráficos 1 e 2. Não houve associação significativa entre compartimentalização da reatividade e natureza (normal ou neoplásica; benigna ou maligna; metastatizante ou não) das amostras.

Tabela 2 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à compartimentalização subcelular da reatividade imuno-histoquímica para as moléculas H4K12ac e H3K36me3.

Grupo	n	H4K12ac		H3K36me3		
		N	C/N	Ausente	N	C/N
Tireoide normal	15	14	1	-	13	2
Adenomas foliculares	10	9	1	-	8	2
Neoplasias malignas	65	56	9	2	45	18
Carcinoma folicular	4	4	-	-	4	-
Carcinoma medular	3	3	-	-	3	-
Carcinoma oncocítico	6	1	5	-	-	6
Carcinoma papilífero	52	48	4	2	38	12
<i>Variante clássica</i>	22	20	2	1	12	9
<i>Variante folicular</i>	20	20		1	18	1
<i>Metastatizante</i>	10	8	2	-	8	2
Todas as amostras	90	79	11	2	66	22

N – Reatividade nuclear isolada. C/N – Reatividade nuclear e citoplasmática concomitantes.

Gráfico 1 – Comparação entre carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireoide segundo a compartimentalização subcelular da reatividade para H4K12ac ($p < 0,0001$; teste exato de Fisher).

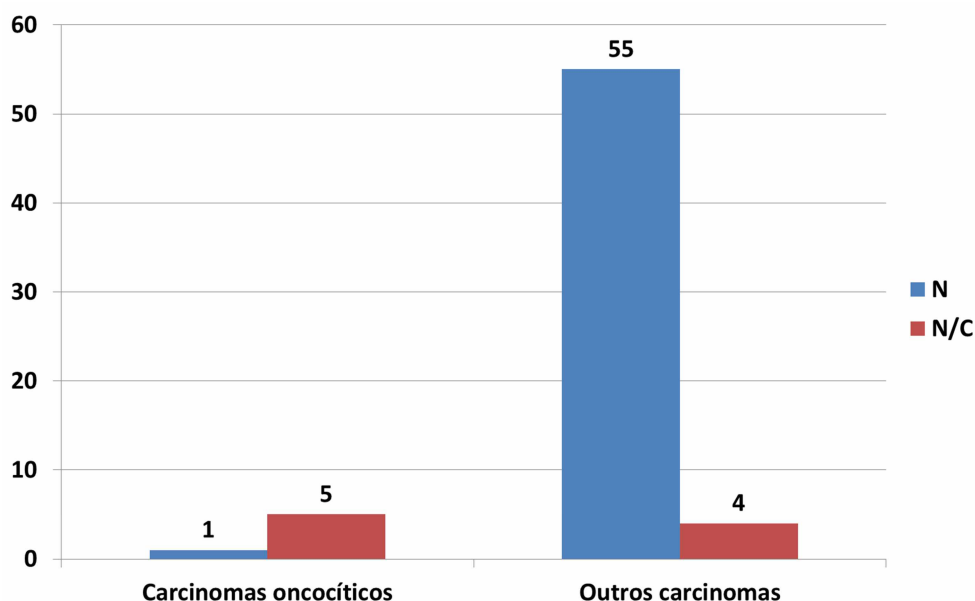
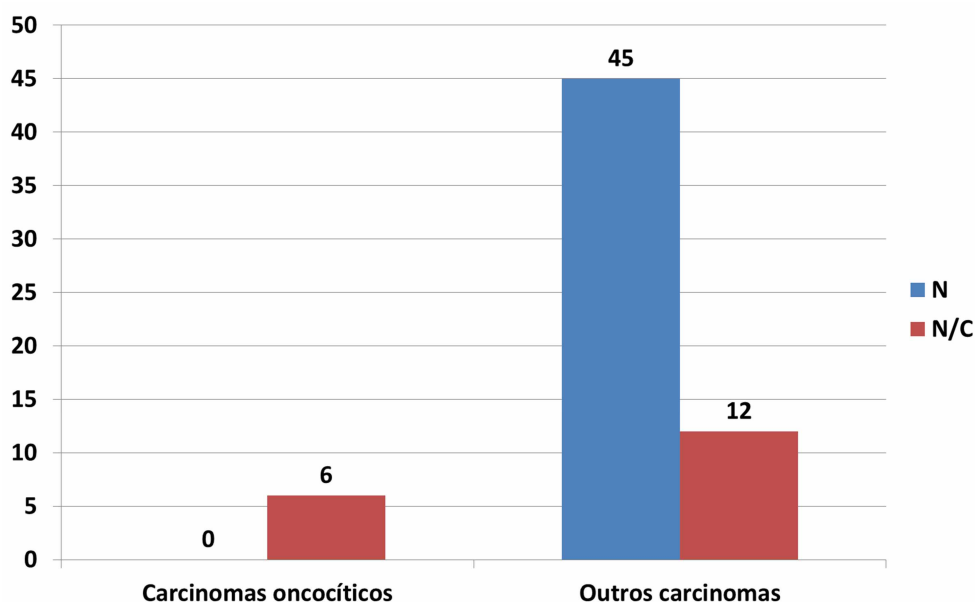


Gráfico 2 – Comparação entre carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireoide segundo a compartimentalização subcelular da reatividade para H3K36me3 ($p < 0,0002$; teste exato de Fisher).



A frequência de reatividade para H4K12ac foi graduada como máxima para todas as amostras avaliadas, conforme apresentado na Tabela 3. Houve maior heterogeneidade quanto à reatividade para H3K36me3, como mostrado na Tabela 4; todavia sem associação

significativa entre frequência de reatividade (casos classificados no grau 6, frente aos demais) e natureza (normal ou neoplásica; benigna ou maligna; metastatizante ou não) das amostras.

Tabela 3 - Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à proporção de células com reatividade imuno-histoquímica para a molécula H4K12ac.

Grupo	Classificação*						
	0	1	2	3	4	5	6
Tireoide normal	-	-	-	-	-	-	15
Adenomas foliculares	-	-	-	-	-	-	10
Neoplasias malignas	-	-	-	-	-	-	65
Carcinoma folicular	-	-	-	-	-	-	4
Carcinoma medular	-	-	-	-	-	-	3
Carcinoma oncocítico	-	-	-	-	-	-	6
Carcinoma papilífero	-	-	-	-	-	-	52
<i>Variante clássica</i>	-	-	-	-	-	-	22
<i>Variante folicular</i>	-	-	-	-	-	-	20
<i>Metastatizante</i>	-	-	-	-	-	-	10
Todas as amostras	-	-	-	-	-	-	90

* - Segundo proporção de células positivas (DETRE et al., 1995).

Tabela 4 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à proporção de reatividade imuno-histoquímica para a molécula H3K36me3.

Grupo	Classificação*						
	0	1	2	3	4	5	6
Tireoide normal	-	-	-	-	1	2	12
Adenomas foliculares	-	-	1	1	-	2	6
Neoplasias malignas	2	-	1	-	2	8	52
Carcinoma folicular	-	-	-	-	-	1	3
Carcinoma medular	-	-	-	-	-	-	3
Carcinoma oncocítico	-	-	-	-	-	-	6
Carcinoma papilífero	2	-	1	-	2	7	40
<i>Variante clássica</i>	1	-	1	-	1	5	14
<i>Variante folicular</i>	1	-	-	-	-	2	17
<i>Metastatizante</i>	-	-	-	-	1	-	9
Todas as amostras	2	-	2	1	3	12	70

* - Segundo proporção de células positivas (DETRE et al., 1995).

Quanto à intensidade de reatividade para H4K12ac, houve predomínio de reações com intensidade moderada, conforme apresentado na Tabela 5. Não foi identificada associação significativa entre este parâmetro (casos segregados entre aqueles com reação intensa e os demais) e a natureza (normal ou neoplásica; benigna ou maligna; metastatizante ou não) das amostras.

Tabela 5 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à intensidade de reatividade imuno-histoquímica para a molécula H4K12ac.

Grupo	Classificação*			
	Ausente	Fraca	Moderada	Forte
Tireoide normal	-	3	8	4
Adenomas foliculares	-	1	5	4
Neoplasias malignas	-	9	31	25
Carcinoma folicular	-	1	1	2
Carcinoma medular	-	1	1	1
Carcinoma oncocítico	-	1	3	2
Carcinoma papilífero	-	6	26	20
<i>Variante clássica</i>	-	2	12	8
<i>Variante folicular</i>	-	3	7	10
<i>Metastatzante</i>	-	1	7	2
Todas as amostras	-	13	44	33

* - Segundo intensidade da reatividade (DETRE *et al.*, 1995).

Para H3K36me3 a distribuição dos casos quanto à intensidade de reação foi novamente heterogênea, conforme mostrado na Tabela 6. Foi identificada associação significativa entre a intensidade de reação e natureza normal ou neoplásica em virtude de baixa proporção de casos com reação ausente ou fraca em tecido normal, conforme mostrado no Gráfico 3. Ainda, também foi detectada associação significativa entre o carcinoma oncocítico e reação moderada ou intensa em comparação aos demais carcinomas, conforme apresentado no Gráfico 4. Finalmente, digno de nota também foi a observação de que todos os carcinomas medulares mostraram reatividade fraca, de forma discrepante com os demais grupos.

Tabela 6 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto à intensidade de reatividade imuno-histoquímica para a molécula H3K36me3.

Grupo	Grupo, segundo intensidade de reação*			
	Ausente	Fraca	Moderada	Forte
Tireoide normal	-	2	10	3
Adenomas foliculares	-	5	4	1
Neoplasias malignas	2	29	29	5
Carcinoma folicular	-	2	1	1
Carcinoma medular	-	3	-	-
Carcinoma oncocítico	-	-	6	-
Carcinoma papilífero	2	24	22	4
<i>Variante clássica</i>	1	11	8	2
<i>Variante folicular</i>	1	8	9	2
<i>Metastatzante</i>	-	5	5	-
Todas as amostras	2	36	43	9

* - Segundo intensidade da reatividade (DETRE *et al.*, 1995).

Gráfico 3 – Comparação entre amostras de tecido tireoidiano normal e neoplasias de tireoide segundo a intensidade da reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,02$; teste exato de Fisher).

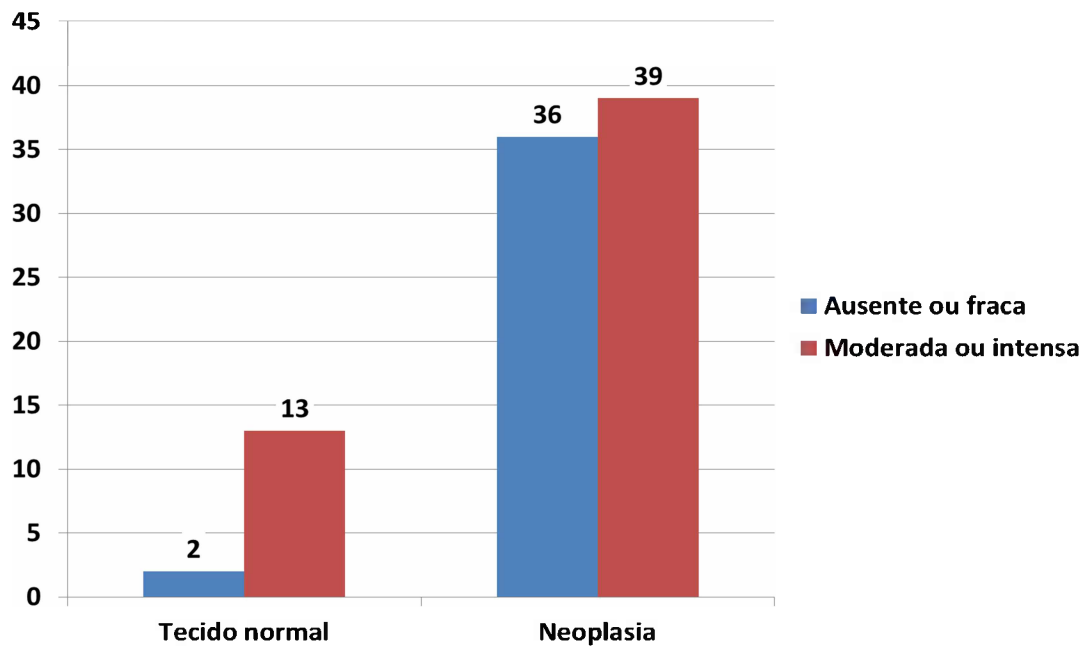
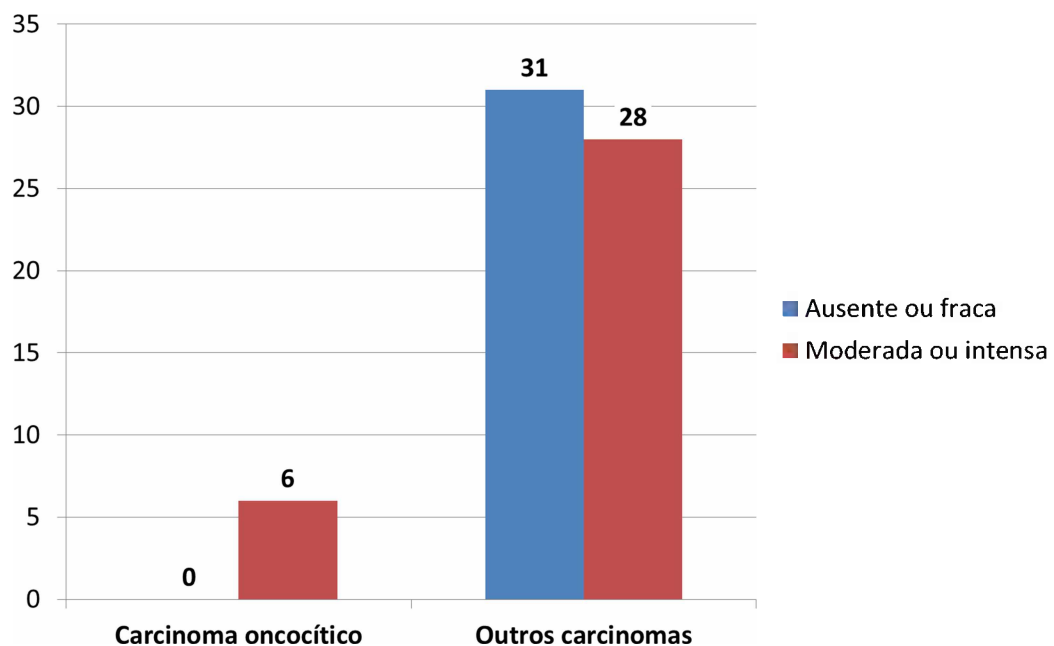


Gráfico 4 – Comparação entre amostras de carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireoide segundo a intensidade da reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,03$; teste exato de Fisher).



Por último, como estabelecido na metodologia, os índices combinados (Quickscore, QI) seriam avaliados segundo um corte no valor médio dos achados, o qual foi de 13,3 para a H4K12ac e de 9,5 para o estudo das moléculas e H3K36me3. Em função disso, foram definidos os valores de corte de 12 e de 10 para segregar as amostras e então compará-las estatisticamente. Assim, identificou-se associação significativa entre valor de QI e natureza normal ou neoplásica da amostra, conforme mostrado no Gráfico 5, e ainda associação entre alto QI e carcinoma oncocítico, conforme apresentado no Gráfico 6.

Tabela 7 – Distribuição de 90 amostras tireoidianas quanto o índice combinado (Quickscore, QI) de reatividade imuno-histoquímica para as moléculas H4K12ac e H3K36me3.

Grupo	Índice Quickscore*			
	H4K12ac		H3K36me3	
	≤ 12	> 12	≤ 10	> 10
Tireoide normal	11	4	3	12
Adenomas foliculares	6	4	6	4
Neoplasias malignas	40	25	34	31
Carcinoma folicular	2	2	3	1
Carcinoma medular	2	1	3	0
Carcinoma oncocítico	4	2	0	6
Carcinoma papilífero	32	20	28	24
<i>Variante clássica</i>	14	8	13	9
<i>Variante folicular</i>	10	10	10	10
<i>Metastatzante</i>	8	2	5	5
Todas as amostras	57	33	43	47

* - Segundo índice QI - quickscore (DETRE et al., 1995).

Gráfico 5 – Comparação entre amostras de tecido tireoidiano normal e neoplasias de tireoide segundo o índice Quickscore de reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,02$; teste exato de Fisher).

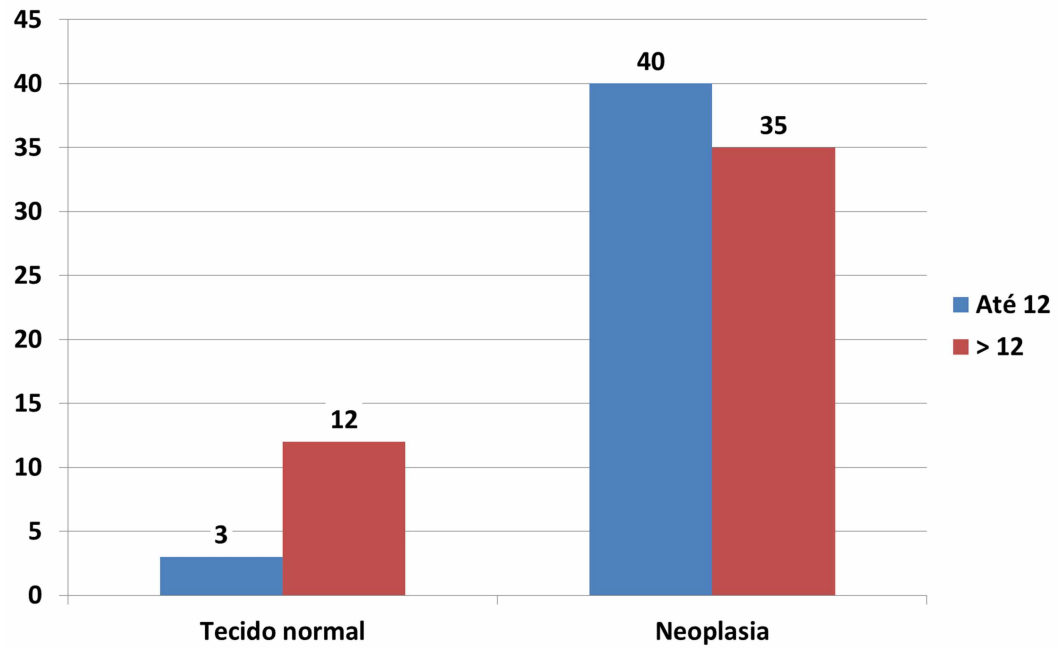
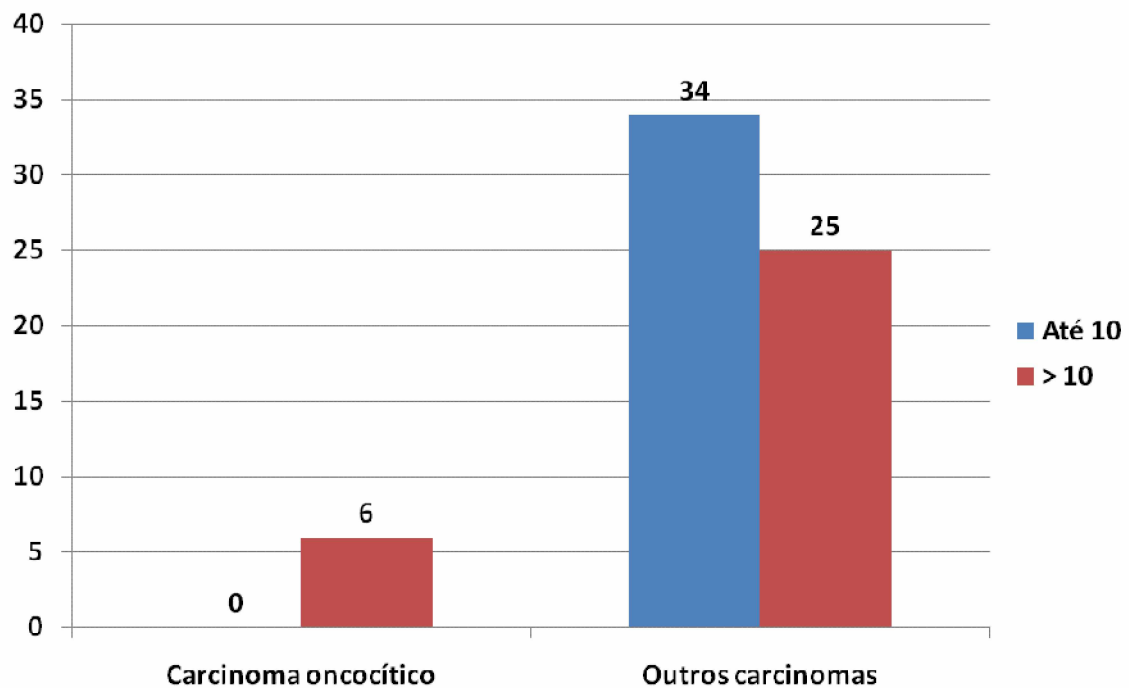


Gráfico 6 – Comparação entre amostras de carcinomas oncocíticos e outros carcinomas de tireoide segundo o índice Quickscore de reatividade para a molécula H3K36me3 ($p = 0,01$; teste exato de Fisher).



Em síntese, não foram observadas diferenças importantes entre os grupos quanto à análise da reatividade imuno-histoquímica da molécula H4K12ac, enquanto que a reatividade para H3K36me3 variou de forma significativa das amostras de tecido normal para as de neoplasia (que apresentaram menor reação), e do carcinoma oncocítico para os demais carcinomas, onde os oncocíticos se mostram com maior intensidade de reação.

6 - DISCUSSÃO



6 - DISCUSSÃO

Os carcinomas de tireoide são, em sua maioria, iniciados por eventos genéticos bem caracterizados, envolvendo mutações somáticas ativadoras nos oncogenes *BRAF* ou *RAS*, bem como a translocação de oncogenes, como *RET/PTC* (FAGIN, 2004). Ainda, vários genes envolvidos no controle da proliferação celular, invasão tecidual, ou relacionados à diferenciação da tireoide, estão epigeneticamente silenciados no câncer de tireoide, como *RASSF1A*, *PTEN*, *TIMP3*, *E-cadherin*, *NIS*, *TTF1* etc. (CATALANO, 2012). Alterações epigenéticas cumulativas desempenham um papel na progressão sequencial dos indolentes tumores de tireoide bem diferenciados para carcinomas metastatizantes (JONES e BAYLIN, 2007). Dentre os poucos estudos publicados relacionando alterações epigenéticas e a neoplasia tireoidiana, já restou demonstrado que:

1. Modificações de histonas, em especial a acetilação e a desacetilação, desempenham papel importante na regulação de genes específicos na carcinogênese da tireoide (KITAZONO, 2001; MITSIADES, 2004).
2. Inibidores de histona-desacetilases (HDAC) aumentam expressão do gene *NIS* em linhagens de células de câncer de tireoide, de maneira independente do fator de transcrição, o que sugere o envolvimento e a importância da acetilação e desacetilação da histona na carcinogênese da tireoide (PUPPIN, 2005).
3. Modificações epigenéticas, em especial a metilação do DNA, inibem a expressão do gene *TTF-1* em células de carcinoma de tireoide, mas agentes desmetilantes podem restaurar sua expressão nessas células, o que abre a possibilidade de usar a TTF-1 como um alvo para a terapia de indução de diferenciação pelas modificações epigenéticas (KONDO, 2009).
4. Altos níveis de expressão de EZH2 (uma metiltransferase de histonas envolvida na oncogênese) são característicos do carcinoma anaplásico de tireoide, e que a inibição dessa enzima resulta em inibição do crescimento celular, além da perda de propriedades de crescimento, migração e invasão (BORBONE, 2011).
5. Níveis de lisinas acetiladas nas posições 9 e 14 da histona H3 (H3K9–K14ac) são significativamente mais elevados em todas as neoplasias tireoidianas do que em tecidos normais; o mesmo ocorrendo com a lisina 18 acetilada da histona H3 (H3K18ac). A avaliação dos níveis de lisina 12 acetilada da histona H4 (H4K12ac)

evidenciou que apenas o adenoma folicular mostrou níveis significativamente mais elevados em comparação com o tecido normal, o que não ocorreu nas neoplasias malignas da tireoide (PUPPIN, 2011).

O presente estudo visou avaliar o padrão de expressão e relevância biológica de modificações de histonas em tecidos tireoidianos neoplásicos ou não, por imuno-histoquímica.

A escolha da H4K12ac foi motivada pelo achado de PUPPIN *et al* (2011), que observaram níveis aumentados dessa modificação no adenoma folicular, mas não no carcinoma folicular, quando comparados ao tecido normal da tireoide. Como a discriminação entre o adenoma (benigno) e o carcinoma (maligno) após citologia de aspiração por agulha fina é por vezes muito difícil, esse achado apontaria para um possível uso dessa marcação como uma importante ferramenta diagnóstica para segregar estes dois tipos de neoplasia. Como será discutido adiante, os presentes resultados não corroboram a observação de PUPPIN *et al* (2011), tampouco o uso da análise imuno-histoquímica de H4K12ac como ferramenta diagnóstica entre tireoide normal, adenoma folicular e carcinoma folicular de tireoide.

A opção pelo estudo de H3K36me3 foi motivada por observações anteriores de que essa variante da histona H3 revelou ser uma marca de áreas transcricionalmente ativas (BANNISTER *et al.* 2005, CHANTALAT, 2011, BLACK *et al.*, 2012, NAG 2013), está relacionada com reparação do DNA durante sua replicação (LI *et al.*, 2013) e também está emergindo como um importante regulador epigenético de crescimento e diferenciação celular (VEZZOLI, 2010). Portanto sua baixa expressão pode estar mais relacionada com mutações e neoplasias.

Nossos resultados mostraram que a reatividade citoplasmática de H4K12ac ou de H3K36me3 diferenciou os carcinomas oncocíticos das demais lesões. As células que formam esses tumores (oncócito ou célula de “Hürttle”) se diferenciam pela grande quantidade de mitocôndrias, que preenchem todo o citoplasma quando observadas à microscopia eletrônica de transmissão (CANNON 2011). A primeira vista poderia se supor que a reatividade citoplasmática estaria ligada ao DNA mitocondrial (mDNA). Todavia, o mDNA é desprovido de histonas, e por isso possui um limitado sistema de reparação, levando-o a sustentar um nível de dano 10 vezes maior que o DNA nuclear (HSU, 2013). Em estudo recente foi demonstrado que tanto histonas do núcleo octamérico quanto de ligação se encontram fortemente aderidas à membrana externa da mitocôndria (CASCONI, 2012). Essa ligação influencia a função mitocondrial, resultando em liberação rápida e maciça do citocromo C,

indicando que as histonas do núcleo podem aumentar a permeabilidade da membrana externa mitocondrial. Esse mesmo estudo levanta a possibilidade que as histonas podem estar envolvidas diretamente na sinalização apoptótica entre as mitocôndrias e o núcleo e que esta função não seria restrita a eventos de estresse genotóxico, mas se estenderia a outras formas de danos do genoma (OKAMURA, 2008; KONISHI, 2003). Portanto, é possível que a marcação citoplasmática no carcinoma oncócito esteja relacionada ao seu conteúdo mitocondrial e consequente presença de histonas em suas membranas, o que poderia explicar outro achado.

Ainda sobre o carcinoma oncócito, foi observada associação significativa entre esse tumor e reatividade moderada ou intensa para H3K36me3, em comparação com os demais carcinomas refletida também na comparação do índice QI da reatividade dessa molécula. Considerando novamente a quantidade de mitocôndrias nas células desse tumor, é provável que a reatividade mais intensa a H3K36me3, tenha a mesma motivação, o que também faz supor a grande presença de H3 no citoplasma do oncócito.

A literatura atesta a associação de baixos índices de acetilação de histonas e piores prognósticos no câncer. Na avaliação por imuno-histoquímica, carcinomas de mama de subtipos que configuram os piores prognósticos apresentam níveis moderados a fracos de marcação para resíduos de lisina acetilados, dentre as quais H4K12ac (ELSHEIKH, 2009). Em câncer de pulmão – predominantemente em adenocarcinomas – há evidente diminuição da acetilação da H4K12 em relação ao tecido normal, que mostra padrão de marcação mais intenso para essa modificação (VAN DEN BROEK, 2008). Menor intensidade de marcação para acetilação em resíduos de lisina de histonas estão associados à recidiva e pior prognósticos em neoplasias de próstata, pulmão e rim (SELIGSON, 2009).

No presente estudo, a reatividade para a molécula H4K12ac foi homogeneamente acentuada em todos os tumores. Além disso, não teria sido possível estabelecer uma relação entre reatividade e diferenciação tumoral, visto que não temos entre nossas amostras, casos de carcinoma pouco diferenciados ou indiferenciados. Tais casos são reconhecidamente raros (SOBRINHO, 2007). Cabe ressaltar que nossos achados, com marcação acentuada em todos os tecidos, não coincidem com os encontrados por PUPPIN *et al* (2011), onde a marcação imuno-histoquímica para a H4K12ac se mostrou mais intensa nos adenomas foliculares, mas não no carcinoma folicular. Ambos estudos se utilizam da mesma metodologia, o mesmo anticorpo policlonal de coelho anti-histona H4K12ac, com pequenas diferenças técnicas.

No presente experimento os espécimes foram incubados com o mesmo anticorpo relatado por PUPPIN *et al* (2011), porém diluído a 1:5000 por duas horas em câmara úmida e temperatura ambiente; no experimento de PUPPIN *et al* (2011) o anticorpo foi diluído a 1:100 e incubado *overnight* a 4°C. Em princípio espera-se resultado semelhante entre as duas técnicas, uma vez que o menor tempo de exposição de uma técnica é compensado pela temperatura mais alta (a ambiente) que favorece uma maior marcação. A avaliação da imunomarcação foi feita de modo semelhante, pois em ambos os estudos foi utilizada a metodologia de classificação por *scores* envolvendo a intensidade de marcação e o percentual de células marcadas, e no mínimo dois observadores realizando a estratificação dos casos. No entanto, aquele grupo utilizou o H-Score (*histo-score*) (McCARTY, 1985 *apud* PUPPIN 2011 e ELSHEIKH, 2009), enquanto nós utilizamos o QI (*quickscore*) (DETRE, 1995). A diferença entre os dois métodos reside no intervalo de resultados possíveis, que no H-score é de 0 a 300, enquanto no QI é de 0 a 18. Contudo a comparação entre os dois métodos e avaliação da equivalência entre eles já foi realizada (DETRE, 1995), sendo que não foi observada vantagem na utilização do intervalo maior do H-score. Apesar das diferenças técnicas, que não se mostram relevantes, podemos afirmar que nossos resultados não validam a possibilidade de utilização dessa marcação (H4K12ac) como meio de distinção entre adenomas e carcinomas foliculares, uma vez que não evidenciamos diferenças na marcação para essa molécula entre os dois grupos.

Diferente da marcação para H4K12ac, onde havia clara uniformidade entre as amostras, na marcação para H3K36me3 observamos maior heterogeneidade na proporção de marcação (com franco predomínio das altas frequências). No entanto, apesar da heterogeneidade dos achados, isso não se traduziu em diferenças significativas na proporção das marcações entre os diversos tecidos estudados nos testes estatísticos aqui utilizados.

No entanto, a proporção de casos com reatividade moderada ou intensa para H3K36me3 foi significativamente maior no tecido normal que nas amostras neoplásicas, fato que se refletiu também em maior proporção de amostras de tireoide normal com QI superior a 12. Esses achados são coerentes com a literatura, tendo em vista o atual entendimento do papel desempenhado por essa marca de histonas no DNA.

A H3K36me3 foi mapeada no genoma de vários organismos e, como já citamos, revelou ser uma marca de áreas transcricionalmente ativas (BANNISTER *et al.* 2005, CHANTALAT, 2011, BLACK *et al.*, 2012, NAG 2013). Recentemente um estudo demonstrou que ela regula a reparação de incompatibilidade do DNA humano (LI *et al.*, 2013). Essa reparação, referida na literatura pela sigla MMR (*mismatch repair*), garante a fidelidade do DNA corrigindo

inadequações geradas durante sua replicação. Em uma revisão, LI (2013) demonstrou que a H3K36me3 é necessária *in vivo* para recrutar proteínas de reconhecimento de incompatibilidade na cromatina. A abundância de H3K36me3 nas primeiras fases da replicação do DNA (G1 e S) assegura o processo. A falta da enzima que catalisa a trimetilação de H3K36 leva ao aparecimento de instabilidades microsatélites (MSI) no genoma e uma frequência elevada de mutações espontâneas. O trabalho de LI *et al* (2013) revelou que a H3K36me3 regula a MMR em células humanas e pode explicar um enigma de longa data das células cancerosas com instabilidade microsatélite, sem que apresentem mutações em genes da MMR.

Estudos evidenciando neoplasia associada a mutações de genes da MMR já foram publicados, mais especificamente o câncer colo-retal ligado à síndrome de Lynch (HSIEH E YAMANE, 2008; BOLAND, 1998; SOREIDE, 2007; POULOGIANNIS, 2010). Isso mostra que é plausível supor que a perda de função da MMR por alterações epigenéticas, como da diminuição da expressão da H3K36me3 nos tecidos neoplásicos tireoidianos, possa estar de alguma forma ligada à tumorigênese tireoidiana.

Por fim, foi notável a observação que todos os carcinomas medulares apresentaram fraca reatividade à H3K36me3, diferente da maioria dos outros carcinomas, ao passo que a marcação para H4K12ac se mostrou moderada e forte, como os outros carcinomas. Como já citado, a menor expressão de H3K36me3 está correlacionada com a menor função da MMR, aparecimento de instabilidades microsatélites e maior quantidade de mutações espontâneas (LI, et al, 2013). Como o carcinoma medular é considerado o de pior prognósticos entre os carcinomas diferenciados da tireoide (HAMMING, 1989), é possível que a menor reatividade para essa histona esteja ligada ao seu comportamento mais agressivo. Estudos posteriores e com casuística maior são necessários para conclusões mais definitivas.

7 - CONCLUSÕES



7 – CONCLUSÕES

Reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac é um evento observado em todas as amostras de tireoide normal, adenomas e carcinomas de tireoide, de forma disseminada nas células parenquimatosas. Portanto, não é possível utilizar o estudo dessa modificação de histonas como um marcador diagnóstico para neoplasia tireoidiana.

Reatividade imuno-histoquímica para H3K36me3 é um evento observado na grande maioria das amostras de tireoide normal, adenomas e carcinomas de tireoide, com variação na proporção de células reativas e na intensidade de marcação. Essa última é maior no tecido normal em comparação às neoplasias, fato que aponta para um possível papel dessa marca de histona na tumorigênese tireoidiana.

A reatividade imuno-histoquímica para H4K12ac e para H3K36me3 é observada usualmente como marcação nuclear restrita, exceto nos carcinomas oncocíticos, em que sempre ocorre marcação citoplasmática. Marcações mais intensas de H3K36me3 são também mais comuns em carcinomas oncocíticos. A associação dessas histonas à membrana mitocondrial pode ser o evento que determina tais diferenças.

Este foi o primeiro estudo a examinar a metilação de resíduos de histonas em tecidos tireoidianos. Nossos dados apontam para participação da H3K36me3 no desenvolvimento de neoplasias tireoidianas, embora não seja possível apresentar conclusões definitivas. Esses achados abrem um campo a ser mais explorado, encorajando a realização de estudos complementares em especial no estudo da metilações de histonas para a tireoide.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B., *et al.* **Molecular Biology of the Cell**, Garland Science, New York, 2008, 1.268 p.
- ANDRADE, C.G.TJ. e JORDÃO, B.Q. O núcleo da célula. In: JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. (Orgs). **Biologia Celular e Molecular**. 8ª Ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2011. P. 141-169.
- BANNISTER, A.J. *et al.* **Spatial Distribution of Di- and Tri-methyl Lysine 36 of Histone H3 at Active Genes**. The J. Biol. Chemistry, v. 280, n. 18, p. 17732–17736, 2005.
- BARBACID M. **RAS genes**. Annu Rev Biochem., v.56, p.779-827, 1987.
- BAYLIN, S.B. and JONES P.A. **A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications**. Nat Rev Cancer, v. 11, p. 726-734, 2011.
- BHASIN, M.; REINHERZ, E.L. and RECHE, P.A. **Recognition and classification of histones using support vector machine**. J. Comput. Biology, v. 13, n. 1, p. 102–12, 2006.
- BELL, O.; *et al.* **Localized H3K36 methylation states define histone H416 acetylation during transcriptional elongation in Drosophila**. The EMBO Journal, v. 26, n. 24, p. 4974-84, 2007.
- BLACK J.C., VAN RECHEM C., WHETSTINE J.R. 2012. **Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact**. *Molecular cell*, v.48, p.491–507, 2012.
- BOLAND CR, *et al.* **A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer**. Cancer Research, v. 58, p.5248–5257, 1998.
- BONGIOVANNI, M.; *et al.* **The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: A Meta-Analysis**. Acta Cytologica, v. 56, p. 333–339, 2012.
- BORBONE, E.; *et al.* **Enhancer of zeste homolog 2 overexpression has a role in the development of anaplastic thyroid carcinomas**. J. Clin. Endocrinol. Metab., v. 96, n. 4, p. 1029–1038, 2011.
- BRACKEN, A.P. *et al.* **EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer**. The Eur. Mol. Biol. Organ. Journal, v. 22, n. 20, p. 5323-5335, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer **Estimativa 2014 Incidência do Câncer no Brasil**. Apresentação disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014_final+corrigido+tireoide.pdf. Acesso em 15 de Dezembro de 2013.
- BRYAN, E.J. *et al.* **Mutation Analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas**. Int. J. Cancer, v. 102, p.137–141, 2002.

- CANNON, J. **The Significance of Hürthle Cells in Thyroid Disease.** The Oncologist, v. 16, p.1380–1387, 2011.
- CARROZZA, M. J.; *et al.* **Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription.** Cell. V. 123, n. 4, p. 581-592, 2005.
- CASARA, D.; *et al.* **Different features of pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: natural history and multivariate statistical analysis of prognostic variables.** The Journal of Nuclear Medicine, v. 34, n. 10, p. 1626-1631, 1993.
- CASCONE, A.; *et al.* **Destabilization of the Outer and Inner Mitochondrial Membranes by Core and Linker Histones.** PLoS one. v. 7, n. 4, e35357, Epub, 2012
- CATALANO, M.G.; FORTUNATI, N. and BOCCUZZI, G. **Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid câncer.** Frontiers in Endocrinology.; v. 3; art. 40, 2012.
- CHANTALAT, S. *et al.* **Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin.** Genome Res. v.21, p. 1426-1437, 2011.
- CHEN MW, *et al.* **H3K9 Histone Methyltransferase G9a Promotes Lung Cancer Invasion and Metastasis by Silencing the Cell Adhesion Molecule Ep-CAM.** Cancer Res, v. 70, p. 7830-7840, 2010.
- CHERVONA, Y. and COSTA, M. **Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis?** Am. J Cancer Res., v.2, n.5, p. 589-597, 2012
- CHI, P.; ALLIS, C.D. and WANG, G. G. **Covalent histone modifications– miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers.** Nat.Rev.Cancer, v. 10, p. 457–459, 2010.
- CHOW, E.J. *et al.* **Risk of Thyroid Dysfunction and Subsequent Thyroid Cancer Among Survivors of Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report from the Childhood Cancer Survivor Study.** Pediatr Blood Cancer. v. 53, n. 3, p. 432–437, 2009.
- CIBAS, E.S. and ALI, S.Z. **The Bethesda System for Thyroid Cytopathology.** Am J Clin Pathol, v. 132, p. 658-665, 2009.
- COHEN, I. *et al.* **Histone Modifiers in Cancer: Friends or Foes?.** Genes & Cancer, v. 2, n. 6, p. 631–647, 2011.
- CREYGHTON, M.P.; *et al.* **Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state.** PNAS – Proc. Nat. Academy of Science, v. 107, n. 50, p. 21931–21936, 2010.
- CURIONI, O.A.; SZELIGA, R.M.S.; CARVALHO, M.B. Anatomia descritiva e cirúrgica da tireoide e paratireoide. In: CARVALHO, M.B **Tratado de Tireoide e Paratireoide.** Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007. Cap. 1, p. 3-18.
- DELELLIS, R.A. *et al.* **Pathology and Genetics tumors of endocrine organs. WHO Classification of Tumors.** IARC Press, Lyon, 2004.

DELELLIS, R.A. **Pathology and Genetics of Thyroid Carcinoma.** Journal of Surgical Oncology, v. 94, p. 662–669, 2006.

DAVIES L.; WELCH HG. **Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002.** JAMA, v. 295, n. 18, p. 2164-2167, 2006.

DETRE, S.; SACCANI JOTTI, G. and DOWSETT, M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. J. Clin Pathol. v.48, p. 876-878. 1995.

ERNST, T. *et al.* **Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders.** Nat Genet., v.;42, p. 722-726, 2010.

ELSHEIKH, S.E.; *et al.* **Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes prognostic factors and patient outcome.** Cancer Research, v. 69, p. 3802–3809, 2009

FAGIN, J.A. **How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy.** J. Endocrinology. v.183, p. 249–256, 2004.

FENG, D.; *et al.* **Targeting of Histone Deacetylases to Reactivate Tumour Suppressor Genes and Its Therapeutic Potential in a Human Cervical Cancer Xenograft Model.** PLoS one. v. 8, n. 11, e80657, Epub, 2013.

FINNEY, R.E. and BISHOP, J.M. **Predisposition to neoplastic transformation caused by gene replacement of H-Ras1.** Science, v. 260, p. 1524-1527, 1993.

FRATES, M.C.; *et al.* **Prevalence and Distribution of Carcinoma in Patients with Solitary and Multiple Thyroid Nodules on Sonography.** The Journal Clin. Endocr. Metabolism, v. 9, n. 9, p. 3411-3417, 2006.

GARCÍA-CAO, M.; *et al.* **Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases.** Nature Genetics, v. 36, n. 1, p. 94-99, 2004.

GARCIA-ROSTAN G, *et al.* **Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer.** J Clin Oncol., v. 21, p. 3226-3235, 2003.

GRAY, H. **Anatomia.** 29^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

GROGAN, R.H; MITMAKER, E.J. and CLARK, O.H. **The Evolution of Biomarkers in Thyroid Cancer - From Mass Screening to a Personalized Biosignature Cancers,** v. 2, p. 885-912, 2010.

GRONBAEK, K.; HOTHER, C. and JONES, P.A. **Epigenetic changes in câncer.** APMIS - Acta Path. Microb. Immun. Scand, v. 115, n.10, p. 1039-1059, 2007.

GU, W. and ROEDER, R.G. **Activation of p53 sequence specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain.** Cell, v.90, p. 595-606, 1997.

HAMBERGER, B.; *et al.* **Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Impact on thyroid practice and cost of care.** Am. Journal of Medicine, v. 73, n. 3, p. 381-4, 1982.

HAMMING JF, **Prognosis and morbidity after total thyroidectomy for papillary, follicular and medullary thyroid cancer.** Eur J Cancer Clin Oncol., v. 25, n. 9, p. 1317-23, 1989.

HASSAN, A.H.; *et al.* **Function and Selectivity of Bromodomains in Anchoring Chromatin-Modifying Complexes to promoter nucleosomes.** Cell, v. 111, p. 369–379, 2002.

HAY I.D.; *et al.* **Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 900 cases observed in a 60-year period.** Surgery, v. 144, n. 6, p. 980-987, 2008.

HERCEG, Z. and MURR, R. **Mechanisms of Histone Modification.** In: Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. Elsevier Inc. [s.l.], 2011. cap. 3, p. 25-45.

HSIEH, P. and YAMANE, K. **DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing** *Mech Ageing Dev.* V.129, n. 7-8, p. 391–407, 2008.

HSU, C.C.; LEE, H.C and WEI, Y.H. **Mitochondrial DNA alterations and mitochondrial dysfunction in the progression of hepatocellular carcinoma.** World J Gastroenterol., v. 19, n. 47, p. 8880-8886, 2013.

ISHIHAMA, K.; *et al.* **Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas.** Journal of Clinical Pathology v. 60, p. 1205–1210, 2007.

IYER, N.G.; OZDAG, H. and CALDAS C. **p300/CBP and cancer.** Oncogene v. 23, p. 4225–4231, 2004.

IZZO, A. and SCHNEIDER, R. **Chatting histone modifications in Mammals.** Brief. In func. Genomics, v. 9, n. 6, p. 429- 443, 2010.

JAYANI, R.S.; RAMANUJAM, P.L. and GALANDE, S. **Studying Histone Modifications and Their Genomic Functions by Employing Chromatin Immunoprecipitation and Immunoblotting.** Methods in cell biology, v.98, p. 35-56, 2010.

JONES, P.A. and BAYLIN, S.B. **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** Nat Rev Genet, v.3, p. 415-428, 2002.

JONES, P.A. and BAYLIN, S.B. **The epigenomics of cancer.** Cell., v. 128, p. 683–692, 2007.

JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO J. **Histologia Básica**, 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KITAZONO M, *et al.* **Low concentrations of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), increase expression of the Na⁺/I⁻ symporter and iodine accumulation in poorly differentiated thyroid carcinoma cells.** J Clin Endocrinol Metab., v. 86, n. 7, p. 3430–3435, 2001.

KONDO, T.; *et al.* **Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas.** *Laboratory Investigation*, v. 89, p. 791–799, 2009.

KONISHI, A. *et al.* **Involvement of Histone H1.2 in Apoptosis Induced by DNA Double-Strand Breaks.** *Cell*, v. 114, p. 673–688, 2003.

KOUZARIDES, T. **Chromatin Modifications and Their Function.** *Cell*, v. 128, p. 693–705, 2007.

KURDISTANI, S.K. **Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view.** *British Journal of Cancer*, v. 97, p. 1–5, 2007.

LI, G.M. **Decoding the histone code: Role of H3K36me3 in mismatch repair and implications for cancer susceptibility and therapy.** *Cancer Res.* v. 73, n. 21, p. 6379–83, 2013.

LI, G.M. *et al.* **The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α .** *Cell*. v. 153, n. 3, p. 590–600, 2013.

LIVOLSI, V.A. **Papillary thyroid carcinoma: an update.** *Modern Pathology*, v.24, p. S1–S9, 2011.

MCCARTY, K.S.; *et al.* **Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 109, p. 716–721, 1985.

MAI, A.; and ALTUCCI, L **Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead.** *Int. j. Biochem. Cell Biology*, v. 41, n. 1, p. 199–213, 2009.

MANUYAKORN, A.; *et al.* **Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 8, p. 1358–1365, 2010.

MARQUES AR, *et al.* **Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas.** *J Clin Endocrinol Metab.*, v.87, n. 8, p. 3947–3952, 2002.

MAZZAFERRI, E.L.; JHIANG S.M. **Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer.** *The Am. Journal Medicine*, v.97, n. 5, p. 418–428, 1994.

MEINKOTH, J.L. **Biology of Ras in thyroid cells.** *Cancer Treat Res.*, v. 122, p.131–148, 2004

MITSIADES, C.S.; *et al.* **Novel histone deacetylase inhibitors in the treatment of thyroid cancer.** *Clin Cancer Research*, v. 11, p. 3958–3965, 2005.

MIZZEN C.A., and ALLIS. C.D., **Linking histone acetylation to transcriptional regulation,** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 54, p. 6–20, 1998.

MOSASHVILLI D, *et al.* **Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma.** Cancer Science, v. 101, n.12, p. 2664–2669, 2010.

NAG, A. *et al.* **Chromatin signature of widespread monoallelic expression.** Elife, v. 2, e01256, 2013

NAMBA, H.; RUBIN, S.A, and FAGIN, J.A. **Point mutations of Ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis.** Mol Endocrinol., v.4, p.1474-1479, 1990.

NIKIFOROVA, M.N. *et al.* **RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma.** The J. of Clin. End. v. 88, n. 5, p. 2318–2326, 2003

NIKIFOROV, Y.E. **Molecular Diagnostics of Thyroid Tumors.** Arch Pathol Lab Med., v. 135, p. 569-577, 2011

NIKIFOROV, Y.E and NIKIFOROVA, M.N. **Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer.** Nat. Rev. Endocrinol. , v.7, p. 569–580, 2011.

NOCITO, A; *et al.* **Tissue microarrays (tmas) for high-throughput molecular pathology research.** International. Journal of Cancer: v. 94, p. 1–5. 2001.

ONO, S.; *et al.* **Acetylated histone H4 is reduced in human gastric adenomas and carcinomas.** Journal of experimental & clinical cancer research, v. 21, n.3, p. 377–382, 2002.

OKAMURA, H.; *et al.* **Histone H1.2 is translocated to mitochondria and associates with Bak in bleomycin-induced apoptotic cells.** J Cell Biochem, v. 103, p. 1488–1496, 2008.

PATEL, K. N. and SINGH, B. **Genetic Considerations in Thyroid Cancer.** Cancer Control, v. 13, n. 2, 2006.

PEYSSONNAUX, C. and EYCHENE A. **The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation.** Biol Cell., v. 93, p. 53-62, 2001.

POULOGIANNIS G.; FRAYLING I.M. and, ARENDS M.J. **DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome.** Histopathology, v. 56, n.2, p.167-79, 2010.

PUPPIN C., *et al.* **Effects of histone acetylation on sodium iodide symporter promoter and expression of thyroid-specific transcription factors.** Endocrinology, v. 146, n. 9, p. 3967–3974, 2005.

PUPPIN, C., *et al.* **Levels of histone acetylation in thyroid tumors.** Biochemical and biophysical research communications, v. 411, n. 4, p. 679–83, 2011.

REZENDE, JM. **História de uma controvérsia – Tiróide ou Tireoide.** Arq. Bras. Endocrinologia e Metabologia, v. 48, n. 3, p. 432-434, 2005.

RIESCO-EIZAGUIRRE G, *et al.* **The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane.** Endocr Relat Cancer, v. 13, n. 1, p.257–269, 2006.

RIES, L.A.G.; *et al.* **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002**. National Cancer Institute, Bethesda, MD. 2005. Disponível em: <seer.cancer.gov/csr/1975_2002/>. Acesso em 12 de Agosto de 2012.

RUSSO, D.; *et al.* **Epigenetics of thyroid cancer and novel therapeutic targets** Journal of Molecular Endocrinology, v. 46, p. R73–R81, 2011.

SANTORO M, *et al.* **Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers**. Br J Cancer, v. 82, p. 315-322, 2000.

SANTORO M, *et al.* **RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors**. J Clin Endocrinol Metab., n.87, p. 370-379, 2002.

SANTOS-ROSA, H. and CALDAS, C. **Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer**. European Journal of Cancer, v. 41, p. 2381–2402, 2005.

SELIGSON D.B.; *et al.* **Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence**. Nature, v. 435, p. 1262–1266, 2005.

SCHNEIDER. R. and GROSSCHEDL, R. **Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression**. Genes Dev., v. 21, p. 3027-3043, 2007.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM D. and JEMAL, A. **Cancer Statistics, 2013**. CA Cancer J. Clinicians, v.63, p.11-30, 2013.

SOBRINHO, J.A.; BARAUNA-NETO, J.C.; CARVALHO, M.B.. Fatores prognósticos nos tumores malignos da gl. tireoidea. In: CARVALHO, M.B. **Tratado de Tireoide e Paratireoide**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007. cap, 33, p. 463-480.

SRINIVAS, P.R.; KRAMER, B.S. and SRIVASTAVA, S. **Trends in biomarker research for cancer detection**. Lancet oncol., v. 2, n. 11, p. 698-704, 2001.

SOARES, F.A.; BEGNAMI, M.D.F. Classificação anatomopatológica das neoplasias da glândula tireoidea. In: CARVALHO, M.B. **Tratado de Tireoide e Paratireoide**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007. cap, 29, p. 411-431.

SOREIDE K. **Molecular testing for microsatellite instability and DNA mismatch repair defects in hereditary and sporadic colorectal cancers—ready for prime time?** Tumor Biology, v. 28, p. 290–300, 2007.

STRAHL, B.D. and ALLIS, C.D. **The language of covalent histone modifications**. Nature v.403, p. 41–45, 2000.

STRUHL, K. **Histone acetylation and transcriptional regulatory? mechanisms**. Genes Dev. v. 1, p. 599-606, 1998.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL A. **Cancer Statistics, 2013**. CA Cancer J. Clinicians, v. 63, p. 11-30, 2013.

TALLINI G. **Molecular pathobiology of thyroid neoplasms**. Endocr. Pathol., v.13, p. 271-288, 2002.

TUTTLE, R.M. **Risk-adapted management of thyroid cancer.** Endocr Pract, v. 14, n. 6, p. 764-774, 2008.

VAN DEN BROEK, A. **Loss of Histone H4K20 Trimethylation Occurs in Preneoplasia and Influences Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer.** Clin Cancer Research, v. 14, p. 7237-7245, 2008.

VARAMBALLY, S.; *et al.* **Genomic Loss of microRNA-101 Leads to Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2 in Cancer.** Science, v. 322, n. 5908, p.1695–1699, 2008.

VEZZOLI A, *et al.* **Molecular basis of histone H3K36me3 recognition by the PWWP domain of Brpf1.** Nat Struct Mol Biol. v. 17, n. 5, p. 617-619, 2010.

VIÉGAS, Judith. **Biologia Celular: Parte I – Estrutura cromossômica em interfase e divisão mitótica (texto).** *Textos Didáticos*, Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2008. 17 p. Disponível em <http://ib.ufpel.edu.br/textdid/biocelcromo.pdf>. Acessado em 28 de Dezembro de 2013.

VIGLIETTO G, *et al.* **RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis.** Oncogene. v. 11, p. 1207-1210, 1995.

VOUTILAINEN, P.E.; *et al.* **Prognosis after lymph node recurrence in papillary thyroid cancer depends on age.** Thyroid, v. 11, n. 11, p. 953-957, 2001.

WADDINGTON, C.H. **The epigenotype.** Endeavour, v. 1, p. 18–20, 1942.

WEICHERT, W.; *et al.* **Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo.** Clinical Cancer Research, v. 14, n. 6, p. 1669–1677, 2008.

WU, H.; *et al.* **Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo.** Cell Research, v. 21, p. 365-367, 2011.

XING, M. **BRAF mutation in thyroid cancer.** Endocr Relat Cancer. v.12, p. 245-262, 2005.

XU, Y. and PRICE, B.D. **Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks.** Cell Cycle v. 10, n. 2, p. 261-267; 2011.

YASSA, L.; *et al.* **Long-term Assessment of a Multidisciplinary Approach to Thyroid Nodule Diagnostic Evaluation.** Cancer, v. 111, n. 6, p. 508-516, 2007

YING, H. *et al.* **Mutant thyroid hormone receptor beta represses the expression and transcriptional activity of peroxisome proliferator- activated receptor gamma during thyroid carcinogenesis.** Cancer Res., v.63, p. 5274-5280, 2003.

ZAYDFUDIM V.; *et al.* **The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma.** Surgery, v. 144, n. 6, p.1070-1077, 2008.

ANEXO I

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Uberlândia/MG

PROJETO DE PESQUISA

Título: Modificações globais de histonas em carcinomas de tireóide

Área Temática:

Pesquisador: SÉRGIO VITORINO CARDOSO

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

CAAE: 02565312.6.0000.5152

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 66983

Data da Relatoria: 17/08/2012

Apresentação do Projeto:

A avaliação de mecanismos epigenéticos tem ganho cada vez mais atenção nos estudos sobre o desenvolvimento dos cânceres de tireóide. Nesse sentido, existe muito pouca informação sobre as consequências da modificação de histonas na carcinogênese de tireóide - uma das principais formas de controle epigênico da expressão gênica. Assim, o presente estudo busca obter dados que contribuam para o esclarecimento do papel da modificação global de histonas durante o processo de progressão tumoral dos carcinomas de tireóide, contribuindo para o refinamento do processo de diagnóstico, mediante a identificação de marcadores de comportamento agressivo. Serão investigados casos de carcinoma papilífero, adenomas foliculares, carcinoma folicular ou carcinoma anaplásico, além de tecido tireoideano normal adjacente aos tumores. Para caracterização da amostra e posterior análise estatística, de cada caso serão recuperadas informações demográficas dos pacientes (sexo e idade), bem como dados clínicos (localização anatômica, tamanho, sinais e sintomas, ocorrência de metástases à distância). Mediante análise de lâminas histológicas recém preparadas e coradas em hematoxilina e eosina, deverão ser verificadas as características histológicas de interesse para o estudo, a saber: tipo histológico, subtipo (para o carcinoma papilífero: formas clássica e variantes), multifocalidade, encapsulamento / invasão capsular, invasão linfonodal, invasão perineural, invasão vascular, contagem de mitoses, e extensão extratireoideana. Matrizes teciduais serão construídas e posteriormente utilizadas para as análise imunoistoquímicas para identificação de alterações específicas de histonas (H3K4me, H3K4me2, H3K18ac, H3K9ac, H3K9me, H3K9me3, H3K14ac, H4K20me3, H3K4me3, H4K12ac, H3K27me2, HP-1). Índices de marcação para cada grupo de interesse serão comparados entre si e, para o carcinoma papilífero, também com fatores clínicos e patológicos atualmente utilizados como definidores de comportamento biológico.

MÉTODOS

Serão investigados casos diagnosticados entre 2006 e 2011 como carcinoma papilífero, adenomas foliculares, carcinoma folicular ou carcinoma anaplásico, além de tecido tireoideano normal adjacente aos tumores. O primeiro é a lesão de interesse específico por se tratar do tipo mais freqüente, e as demais serão avaliadas para fins de comparação em termos de cito e histodiferenciação, além de agressividade tumoral (especialmente o adenoma folicular e o carcinoma anaplásico, antípodas em termos de comportamento biológico).

CÁLCULO AMOSTRAL

Dados já publicados na literatura, indica a necessidade de avaliação de 10 casos por grupo para comparação adequada entre eles (diferença mínima significativa de 50 pontos no índice de reatividade, desvio-padrão de 25 pontos, cinco grupos de amostras, e nível alfa de 0,01). Para o carcinoma anaplásico, reconhecidamente raro, todos os casos disponíveis deverão ser avaliados. Total de amostras: 40.

FONTES DE PESQUISA

Todas as fontes de material e informação necessários ao estudo serão provenientes de arquivo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Os casos de interesse serão identificados por consulta aos registros de pacientes em acompanhamento pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, disponíveis no próprio serviço. Informações demográficas e clínicas serão obtidas dos registros hospitalares, enquanto que os dados histopatológicos e os ensaios imunoistoquímicos serão obtidos pela avaliação de lâminas e blocos, respectivamente, provenientes dos mesmos

arquivos, e que foram obtidos mediante protocolos clínicos necessários para diagnóstico das lesões, os quais foram totalmente independentes do protocolo aqui apresentado. Para caracterização da amostra e posterior análise estatística, de cada caso serão recuperadas informações demográficas dos pacientes (sexo e idade), bem como dados clínicos (localização anatômica, tamanho, sinais e sintomas, ocorrência de metástases a distância).

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As características histológicas de interesse para o estudo a saber: tipo histológico, subtipo (para o carcinoma papilífero: formas clássica e variantes), multifocalidade, encapsulamento / invasão capsular, invasão linfonodal, invasão perineural, invasão vascular, contagem de mitoses, e extensão extratireoideana.

ENSAIOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Cortes parafinados das matrizes teciduais com 3 micrômetros de espessura serão submetidos a recuperação antigênica com solução de ácido cítrico em forno de microondas. Será então realizado o bloqueio da atividade de peroxidase endógena, seguida por incubação com os anticorpos primários, produzidos contra as seguintes formas de histonas: H3K4me, H3K4me2, H3K18ac, H3K9ac, H3K9me, H3K9me3, H3K14ac, H4K20me3, H3K4me3, H4K12ac, H3K27me2, bem como contra a proteína HP-1. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes serão incubados com sistema de amplificação conjugado com peroxidase. Em seguida, a reação será revelada com substrato cromogênico pré-diluído (3,3'-diaminobenzidina, Sigma), seguido por contracoloração com hematoxilina de Harris e montadas com bálsamo do Canadá. Cada caso deverá ser classificado como reativo ou não reativo para os marcadores de interesse, e para os casos positivos deverá haver ainda estimativa do número de células reativas.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos inicialmente todos os casos diagnosticados (DeLellis e Williams, 2004) como carcinoma papilífero, adenomas foliculares, carcinoma folicular ou carcinoma anaplásico, nos anos de 2006 a 2011.

Critério de Exclusão:

O material a ser utilizado consiste em blocos de tecido provenientes de biópsias, os quais são arquivados por determinação legal (Conselho Federal de Medicina / Parecer-Consulta 27 de 1994; Sociedade Brasileira de Patologia / Parecer 62 de 2006) que prevê a possibilidade de se fazer necessária revisão diagnóstica mediante avaliação do material arquivado. Dessa forma, serão excluídos todos os casos cujo material (blocos histopatológicos) não seja suficiente para execução dos ensaios imunoistoquímicos e posterior preservação para revisão diagnóstica, se necessária.

Análise estatística

A marcação imunoistoquímica de cada antígeno de interesse será descrita por medidas de frequência absoluta e percentual (por categorias), bem como com medidas de tendência central (média, desvio-padrão e variação). Para fins analíticos, conforme as metas apresentadas no item 2, a comparação dos índices médios de marcação entre os diferentes tipos de tumores será empregado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Para a comparação das diferentes moléculas em cada um dos tumores, a análise deverá ser inicialmente exploratória e descritiva para identificar possíveis alterações na expressão (aumento ou diminuição), seguindo-se por teste de qui-quadrado para verificação de possíveis associações entre reatividade e características clínicas e histopatológicas. Serão consideradas significativas apenas aquelas associações cuja probabilidade de terem sido obtidas ao acaso seja inferior a 5%. Todas as análises serão realizadas com o emprego do software GraphPad Prism 5.0.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Obter dados que contribuam para o esclarecimento do papel da modificação global de histonas durante o processo de progressão tumoral dos carcinomas de tireoide. Se possível, contribuir para o refinamento do processo de diagnóstico, mediante a identificação de marcadores específicos de comportamento agressivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco previsto é o de quebra de sigilo quanto a informações arquivadas. Para evitá-lo, a equipe proponente se compromete a manter todas as informações pessoais dos pacientes codificadas de tal forma que não seja permitida identificação pessoal, e além disso manter todos os dados individuais

sob posse apenas da própria equipe proponente, especificamente sob responsabilidade do Pesquisador Principal. Como não haverá nenhum contato direto com os pacientes, não se prevê risco ou desconforto físico a partir deste estudo.

Benefícios:

O conhecimento sobre modificações de histonas tem sido considerada muito importante em diversas neoplasias malignas, e seu estudo em carcinomas de tireóide pode trazer informações importantes para a compreensão da biologia e da progressão tumoral, com perspectivas de melhoria nos procedimentos atuais de diagnóstico e tratamento dessa doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho bem elaborado, bem delineado, com importância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os termos obrigatórios.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data de entrega de relatório final: junho de 2013.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Orientações ao pesquisador

ζ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

ζ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

ζ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ζ ANVISA ζ junto com seu posicionamento.

ζ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las

também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

04 de Agosto de 2012

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado

ANEXO II

Anexo II – Dados clínicos e resultados da análise da imuno-histoquímica para as modificações de histonas H4K12ac e H3K36me3 em neoplasias da tireoide.

Dados Clínicos				H4K12ac				H3K36me3			
Caso	Grupo	Idade	Sexo	Localização	PPC	IS	QS	Localização	PPC	IS	QS
1	Adenoma	53	F	N	6	3	18	N	2	1	2
2	Adenoma	48	M	N	6	3	18	N	6	1	6
3	Adenoma	28	M	N	6	2	12	N	5	2	10
4	Adenoma	65	F	N	6	2	12	N	3	1	3
5	Adenoma	55	F	C/N	6	2	12	C/N	6	2	12
6	Adenoma	28	F	N	6	2	12	C/N	6	2	12
7	Adenoma	31	F	N	6	3	18	N	5	1	5
8	Adenoma	47	F	N	6	2	12	N	6	3	18
9	Adenoma	33	F	N	6	1	6	N	6	1	6
10	Adenoma	52	F	N	6	3	18	N	6	2	12
11	Ca Folicular	31	F	N	6	1	6	N	5	2	10
12	Ca Folicular	47	F	N	6	2	12	N	6	1	6
13	Ca Folicular	18	F	N	6	3	18	N	6	3	18
14	Ca Folicular	44	F	N	6	3	18	N	6	1	6
15	Ca Medular	66	M	N	6	3	18	N	6	1	6
16	Ca Medular	48	M	N	6	1	6	N	6	1	6
17	Ca Medular	28	M	N	6	2	12	N	6	1	6
18	Ca Oncocítico	66	F	C/N	6	1	6	C/N	6	2	12
19	Ca Oncocítico	51	F	C/N	6	2	12	C/N	6	2	12
20	Ca Oncocítico	72	F	C/N	6	3	18	C/N	6	2	12
21	Ca Oncocítico	40	F	C/N	6	3	18	C/N	6	2	12
22	Ca Oncocítico	54	F	N	6	2	12	C/N	6	2	12
23	Ca Oncocítico	37	F	C/N	6	2	12	C/N	6	2	12
24	CP c/ Metástase	23	F	N	6	2	12	N	6	2	12
25	CP c/ Metástase	48	F	N	6	2	12	N	6	1	6
26	CP c/ Metástase	64	M	C/N	6	2	12	C/N	6	2	12
27	CP c/ Metástase	23	F	N	6	3	18	N	6	2	12
28	CP c/ Metástase	78	F	N	6	2	12	C/N	6	2	12
29	CP c/ Metástase	44	M	N	6	2	12	N	6	1	6
30	CP c/ Metástase	23	F	N	6	3	18	N	6	1	6
31	CP c/ Metástase	23	F	N	6	2	12	N	6	2	12
32	CP c/ Metástase	21	F	N	6	3	18	N	6	1	6
33	CP c/ Metástase	45	F	C/N	6	1	6	N	4	1	4
34	CP Clássico	70	F	N	6	2	12	C/N	6	2	12
35	CP Clássico	77	F	N	6	2	12	C	6	1	6
36	CP Clássico	49	M	N	6	3	18	N	6	2	12
37	CP Clássico	16	F	N	6	2	12	N	5	1	5

38	CP Clàssico	64	F	N	6	2	12	N	6	3	18
39	CP Clàssico	54	F	N	6	2	12	N	5	1	5
40	CP Clàssico	63	F	N	6	1	6	N	6	2	12
41	CP Clàssico	33	F	N	6	3	18	N	2	1	2
42	CP Clàssico	45	F	C/N	6	2	12	C/N	6	2	12
43	CP Clàssico	21	M	N	6	3	18	N	5	1	5
44	CP Clàssico	53	F	N	6	2	12	C/N	6	2	12
45	CP Clàssico	46	F	N	6	2	12	N	5	1	5
46	CP Clàssico	53	M	N	6	2	12	C/N	5	2	10
47	CP Clàssico	48	M	N	6	2	12	0	0	0	0
48	CP Clàssico	57	F	N	6	3	18	C	6	1	6
49	CP Clàssico	33	F	N	6	2	12	N	4	1	4
50	CP Clàssico	42	F	N	6	3	18	C/N	6	2	12
51	CP Clàssico	22	F	N	6	3	18	N	6	3	18
52	CP Clàssico	25	F	N	6	3	18	C/N	6	2	12
53	CP Clàssico	36	F	N	6	2	12	C/N	6	1	6
54	CP Clàssico	18	F	N	6	3	18	N	6	1	6
55	CP Clàssico	16	F	C/N	6	1	6	N	6	1	6
56	CP folicular	36	F	N	6	2	12	N	5	1	5
57	CP folicular	61	F	N	6	1	6	N	6	1	6
58	CP folicular	49	M	N	6	3	18	N	5	2	10
59	CP folicular	20	M	N	6	2	12	0	0	0	0
60	CP folicular	49	F	N	6	2	12	N	6	2	12
61	CP folicular	37	F	N	6	2	12	N	6	1	6
62	CP folicular	63	M	N	6	2	12	N	6	1	6
63	CP folicular	51	F	N	6	1	6	N	6	2	12
64	CP folicular	13	F	N	6	2	12	N	6	1	6
65	CP folicular	43	F	N	6	3	18	N	6	2	12
66	CP folicular	36	F	N	6	3	18	N	6	1	6
67	CP folicular	68	F	N	6	3	18	N	6	2	12
68	CP folicular	36	F	N	6	3	18	N	6	2	12
69	CP folicular	70	F	N	6	3	18	N	6	3	18
70	CP folicular	44	F	N	6	3	18	N	6	3	18
71	CP folicular	21	F	N	6	3	18	N	6	1	6
72	CP folicular	52	F	N	6	2	12	N	6	2	12
73	CP folicular	30	F	N	6	3	18	N	6	2	12
74	CP folicular	47	F	N	6	3	18	C/N	6	2	12
75	CP folicular	43	M	N	6	1	6	N	6	1	6
76	Tir. Normal	23	F	C/N	6	2	12	C/N	6	2	12
77	Tir. Normal	52	F	N	6	2	12	N	6	2	12
78	Tir. Normal	42	F	N	6	2	12	N	6	2	12
79	Tir. Normal	30	F	N	6	2	12	N	6	2	12
80	Tir. Normal	36	F	N	6	1	6	N	6	2	12
81	Tir. Normal	36	F	N	6	2	12	N	6	2	12
82	Tir. Normal	18	F	N	6	3	18	N	5	2	10

83	Tir. Normal	68	F	N	6	3	18	N	6	2	12
84	Tir. Normal	47	F	N	6	2	12	N	6	2	12
85	Tir. Normal	44	F	N	6	2	12	N	6	2	12
86	Tir. Normal	45	F	N	6	3	18	C/N	6	1	6
87	Tir. Normal	44	F	N	6		0	N	6	3	18
88	Tir. Normal	52	F	N	6	1	6	N	4	1	4
89	Tir. Normal	38	F	N	6	3	18	N	6	3	18
90	Tir. Normal	43	F	N	6	2	12	N	5	3	15

Ca – carcinoma. CP – carcinoma papilífero. Tir - Tireoide. F – feminino. M – masculino. N – núcleo. C/N – citoplasma e núcleo. PPC – proporção de células positivas. IS - Intensidade da coloração. QS – quick score index.