

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JULIANA MOTA PEREIRA

**Estudo imuno-histoquímico da fosfo-histona-3 (serina-10)
em neoplasias de tireóide**

UBERLÂNDIA

2015

JULIANA MOTA PEREIRA

**Estudo imuno-histoquímico da fosfo-histona-3 (serina-10)
em neoplasias de tireóide**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

UBERLÂNDIA

2015

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

P436e
2015 Pereira, Juliana Mota, 1978
 Estudo imuno-histoquímico da fosfo-histona-3 (serina-10) em
 neoplasias de tireóide [recurso eletrônico] / Juliana Mota Pereira. - 2015.

 Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.854>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Citologia. 2. Tireóide - Câncer. 3. Histonas. 4.
 Imunohistoquímica. I. Cardoso, Sérgio Vitorino, (Orient.) II.
 Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

*Ao meu companheiro de todos os momentos, Saadallah, e à
minha família, pelo apoio, carinho e paciência incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente àqueles que estiveram presentes nessa caminhada, me apoiando e me dando condições de aprender um pouco mais.

Ao meu namorado, Saadallah, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e me dando força a cada momento, com toda paciência e carinho... Sem ele tudo teria sido muito mais difícil!

À minha mãe, Olga, pelos cuidados e carinho de sempre;

Ao meu irmão, Julio, que me deu condições para trilhar o caminho até aqui;

Ao meu irmão, Juarez, que me ilumina e protege aonde quer que eu vá.

Às princesinhas Maria Julia e Marina, que enchem meus dias de alegria!

Ao meu orientador, Professor Dr. Sérgio Vitorino Cardoso, por me dar a chance de aprender tanto ao seu lado; pela imensa paciência, gentileza, atenção e pelo tempo dedicado a me ensinar.

A todos os colaboradores desse projeto, pelo imenso auxílio em todas as etapas: João Paulo Silva Servato, Sávio de Moraes, Carla Siqueira e Tamiris Sabrina Rodrigues. Muito obrigada!

Aos professores das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, que sempre ensinaram e orientaram todos nós alunos da melhor forma possível! Aos colegas que cursaram comigo as disciplinas, em especial a agora também amiga Leana Ferreira Crispim, companheira de jornada, sempre disposta a me ajudar.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

À Capes e à Fapemig pelo incentivo prestado durante esse tempo.

APOIO FINANCEIRO

Esta dissertação foi desenvolvida a partir de projeto de pesquisa parcialmente financiado pela Universidade Federal de Uberlândia, FAPEMIG (processo APQ-02495-12), CNPq (PIBIC/CNPq/2012-0359).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O câncer de tireóide é a neoplasia maligna endócrina mais comum e corresponde a até 2% de todos os cânceres. Nas últimas décadas a sua incidência vem aumentando em todo o mundo, especialmente às custas do carcinoma papilífero (CPT). Embora a mortalidade por CPT seja considerada baixa, uma minoria de casos pode ter um comportamento agressivo com rápida evolução para o óbito. Cerca de 10 a 15% das punções aspirativas por agulha fina falham em separar lesões tireoidianas benignas de malignas. Em alguns desses casos, mesmo o diagnóstico por biopsia pode ser difícil. Nos últimos anos, inúmeros estudos têm mostrado evidências de que alterações epigenéticas, tais como modificações pós-traducionais de histonas, contribuem para o surgimento e a progressão de vários tipos de câncer. A partir desses pressupostos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da forma fosforilada da serina 10 da histona 3 (H3S10p) no câncer de tireóide, especialmente no CPT, de forma a, se possível, contribuir para o refinamento do processo de diagnóstico e para a predição do comportamento dos tumores tireoidianos. Assim, através da técnica de imunohistoquímica, investigou-se a expressão de H3S10p em 14 amostras de tireóide normal, em 10 casos de adenomas foliculares e em 61 casos de carcinomas tireoidianos (papilíferos, foliculares, oncocíticos e medulares), sendo 48 casos de CPT, com ênfase na comparação com os achados histopatológicos deste último. Cada reação foi avaliada de forma qualitativa e quantitativa através do índice Quickscore. Foi verificado que houve uma redução gradativa da reatividade para H3S10p da tireóide normal para os adenomas, e desses para os carcinomas, de forma que casos com reatividade baixa ou ausente predominaram nas neoplasias malignas. Todavia, o uso dessa associação como ferramenta auxiliar ao diagnóstico não pode ser tomada como absoluta frente à existência de casos não reativos dentre as amostras de tireóide normal e de adenomas. Não houve diferença significativa nos índices de Quickscore entre os diferentes tipos histológicos de carcinomas. Não se identificou nenhuma associação significativa entre a reatividade para H3S10p e os parâmetros clínicos e histopatológicos, exceto a faixa etária. Tais resultados apontam para uma provável contribuição da fosforilação de H3S10 para a carcinogênese tireoidiana. Fica evidente ainda a contribuição que a avaliação das modificações de histonas pode trazer para a compreensão do desenvolvimento e progressão de tumores.

Palavras-chave: câncer de tireóide, modificações de histonas, phosphohistone H3

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy and accounts for almost 2% of all cancers. Its incidence has been increasing over the last decades worldwide, especially because of the papillary thyroid carcinoma (PTC). Even though the mortality of PTC is low, a few cases show an aggressive behavior leading rapidly to death. Among 10 and 15 % of fine needle aspiration cytologies fail in distinguishing between benign thyroid lesions from malignant ones. In some cases, even the diagnosis from a biopsy can be difficult. In the last years, countless studies have emerged to show evidences of epigenetic changing contributions, such as post translational modification of histones, in the development and progression of various cancer types. Based on these assumptions, the present study aimed at assessing the role of the histone H3 phospho S10 (H3S10p) in thyroid neoplasm, in order to determine its contribution in establishing a precise diagnosis and also a behavioral prediction. For this, an immunohistochemistry tool was needed to investigate H3S10p expression in 14 samples of normal thyroid tissue, 10 cases of follicular adenomas and 61 cases of thyroid carcinomas (papillary, follicular, oncocytic and medullary) including 48 samples of PTC, emphasizing in the comparison of histopathological findings in PTC cases. Each reaction was analyzed qualitatively and quantitatively by using Quickscore index. The current study showed a gradual decrease in H3S10p reactivity from normal thyroid to adenomas, and from these to carcinomas, thus showing a low or absent reactivity in malignant cases. However, the use of this association as an auxiliary tool in thyroid cancer diagnosis cannot be taken as an absolute rule, since we also found negative reactivity in normal thyroid and adenomas. There was no significant difference in Quickscore findings among all histological types of carcinomas. There was also no significant association between H3S10p reaction and clinical and histopathological parameteres, except for age. These results just point out to the involvement of the H3S10 in thyroid carcinogenesis. In addition, it becomes evident that the histone modification assessment in understanding of tumor carcinogenesis is surely interesting.

Key words: thyroid cancer, histone modifications, phosphohistone H3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos histopatológicos do carcinoma papilífero de tireóide, mostrando a interface invasiva e não capsulada com tecido tireoidiano normal (A), arquitetura papilar (B), núcleos de cromatina condensada na margem e aspecto de “olhos da órfã Annie” (C) e pseudoinclusão nuclear (D). Coloração de hematoxilina e eosina23

Figura 2 - Personagem “pequena órfã Annie”, cujos olhos vazios se parecem ao aspecto distinto do núcleo do carcinoma papilífero de tireóide (CPT) que, ao contrário do hiperchromatismo que se observa comumente em neoplasias malignas, parece “vazio”. Curiosamente, o nome do cão que a acompanha, chamado de “Sandy” (“arenoso”, em Inglês) também é aplicável ao CPT, mas aos seus corpos psamomatosos (do Grego “psammos”, traduzível como “areia”, e “oma”, “tumor”). Fonte: <http://goo.gl/DpVnqI>, acesso em 25/01/2015.....23

Figura 3 - Imagens representativas da imunorreatividade para H3S10p em amostras de tireóide normal (A), adenoma folicular (B), carcinoma papilífero clássico (C), carcinoma papilífero, variante folicular (D), carcinoma oncocítico (E), e carcinoma medular (F) de tireóide. Ampliação original de 400×.....41

LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

- Gráfico 1-** Incidência do carcinoma papilífero de tireóide nos Estados Unidos entre 1988 e 2008, de acordo com o tamanho da lesão (NIKIFOROV e OHORI, 2012)..... 18
- Quadro 1-** Parâmetros, classes e valores utilizados para avaliação das reações imuno-histoquímicas (DETRE, JOTTI e DOWSETT, 1995)..... 39
- Tabela 1-** Distribuição dos casos selecionados, segundo natureza das amostras biológicas, tipo histológico dos tumores, sexo e idade dos pacientes..... 40
- Tabela 2-** Distribuição dos casos selecionados, segundo natureza das amostras biológicas, tipo histológico dos tumores, proporção de casos reativos e índice Quickscore (QS)..... 42
- Gráfico 2-** Reatividade (média e desvio-padrão) para H3S10p em amostras de tireóide normal, adenomas e carcinomas de tireóide ($p < 0,02$, teste de Kruskal-Wallis; asterisco mostra diferença significativa entre pares, pós-teste de Dunn)..... 42
- Gráfico 3-** Reatividade (média) para H3S10p em diferentes carcinomas de tireóide ($p = 0,017$, teste de Kruskal-Wallis). 43
- Gráfico 4-** Reatividade (média) para H3S10p em amostras de carcinomas papilíferos de tireóide, segregados em casos primários não-metastatizantes e metastatizantes para linfonodos (PNM e PM, respectivamente; $p = 0,31$, teste U de Mann-Whitney). 43
- Tabela 3-** Distribuição dos carcinomas papilíferos de tireóide segundo parâmetros clínicos e patológicos, bem como comparação da reatividade imuno-histoquímica para H3S10p entre grupos diferentes, segundo o índice de Quickscore 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: difosfato de adenosina (do inglês, *adenosine diphosphate*)

CFT: carcinoma folicular de tireóide

ChIP: imunoprecipitação de cromatina (do inglês, *chromatine immunoprecipitation*)

ChIP-chip: imunoprecipitação de cromatina com microarranjo (do inglês, *chromatine immunoprecipitation with DNA microarray*)

ChIP-seq: imunoprecipitação de cromatina com sequenciamento de DNA (do inglês, *chromatine immunoprecipitation with DNA sequencing*)

CPT: carcinoma papilífero de tireóide

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

ERK: quinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*)

H3K9/14: lisinas 9 e 14 da histona H3

H3K9ac: acetilação da lisina 9 da histona H3

H4K12ac: acetilação da lisina 12 da histona H4

H3K9me2: dimetilação da lisina 9 da histona 3

H3K27me3: trimetilação da lisina 27 da histona 3

H3K36me3: trimetilação da lisina 36 da histona 3

H3S10: serina 10 da histona H3

H3S10p: fosforilação da serina 10 da histona H3

HAT: acetil-transferase de histonas (do inglês, *histone acetyltransferase*)

HDAC: desacetilase de histonas (do inglês, *histone deacetylase*)

IS: intensidade da reação (do inglês, *stain intensity*)

MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês, *mitogen activated protein kinases*)

MPTH: modificações pós-traducionais de histonas

mtDNA: DNA mitocondrial

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAAF: punção aspirativa por agulha fina

PM: primário metastatizante

PNM: primário não metastatizante

PPC: proporção de células positivas (do inglês, *proportion of positive cells*)

QS: do inglês, *Quickscore*

RNA: ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

TMA: microarranjo tecidual (do inglês, *tissue microarray*)

TTF-1: fator de transcrição de tireóide-1 (do inglês, *thyroid transcription factor-1*)

VFCPT: variante folicular do carcinoma papilífero de tireóide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. A glândula tireóide	16
2.1.1. Anatomia macroscópica e microscópica.....	16
2.2. Tumores malignos da tireóide	17
2.2.1. Incidência e epidemiologia	17
2.2.2. Classificação	18
2.3. Carcinoma papilífero de tireóide	19
2.3.1. Considerações gerais.....	19
2.3.2. Etiologia.....	20
2.3.3. Patologia	21
2.3.4. Desafios no diagnóstico histopatológico dos carcinomas diferenciados de tireóide.....	25
2.3.5. Fatores prognósticos dos carcinomas diferenciados da tireóide	26
2.4. Alterações epigenéticas	27
2.4.1. As histonas	28
2.4.2. Modificações pós traducionais de histonas	30
2.4.3. Envolvimento de H3S10 fosforilada em neoplasias	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos.....	35

4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Definição dos casos de interesse.....	36
4.2. Matrizes teciduais	37
4.3. Imuno-histoquímica.....	38
4.4. Análise da imunomarcção.....	39
4.5. Tabulação de resultados e análise estatística	39
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética.....	61

1. INTRODUÇÃO

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é considerada um exame de primeira linha na avaliação de nódulos tireoidianos. É um método sensível que tem grande utilidade na triagem inicial dos pacientes, separando as lesões benignas das demais e reduzindo enormemente as cirurgias desnecessárias (SINNA e EZZAT, 2012). Entretanto, cerca de 10 a 15% das PAAF falham em separar lesões tireoidianas benignas de malignas (GROGAN, MITMAKER e CLARK, 2010). Além disso, mesmo em biopsias, o diagnóstico diferencial entre a variante folicular do carcinoma papilífero de tireóide (VFCPT), o carcinoma folicular de tireóide (CFT) e o adenoma folicular pode ser um desafio para o patologista (LIVOLSI, 2011).

Diagnosticar um adenoma folicular em vez de um carcinoma papilífero de tireóide (CPT) pode ser desastroso quando se leva em consideração que uma pequena parte desses carcinomas pode ter comportamento agressivo e possuir prognóstico bastante desfavorável. Estudos imuno-histoquímicos e moleculares ainda não conseguiram resolver definitivamente essa questão (AL BRAHIM e ASA, 2006; LIVOLSI, 2011). Por isso, a descoberta de um marcador molecular confiável que diferencie essas lesões seria de grande utilidade para o diagnóstico e tratamento do câncer de tireóide.

Ainda, a possibilidade de se encontrar um marcador molecular que separe os CPT agressivos dos demais é motivadora. A existência de um marcador confiável de prognóstico seria de grande importância na definição da abordagem cirúrgica e pós-cirúrgica dos casos de CPT, evitando assim cirurgias agressivas desnecessárias para casos de menor risco e tratando adequadamente os casos com alto potencial de recidiva e evolução para óbito.

Por tudo isso, é extremamente instigante a possibilidade de se identificar alterações moleculares confiáveis que possam distinguir os nódulos tireoidianos benignos dos malignos, bem como marcadores que possam identificar os tumores malignos com maior potencial de agressividade. Nesse contexto, a pesquisa epigenética surge como uma grande promessa dentro dos esforços constantes em se melhorar o manejo dos tumores tireoidianos (GROGAN, MITMAKER e CLARK, 2010).

Na literatura, existem ainda muito poucas informações sobre as modificações de histonas e sua relação com o câncer de tireóide (CATALANO FORTUNATI e BOCCUZZI, 2012). Recentemente, apenas um estudo descreveu a relevância da acetilação de histonas nessas doenças (PUPPIN et al., 2011), não havendo ainda relatos sobre a relação entre fosforilação

da histona H3 e câncer tireoidiano. Portanto, vislumbra-se um amplo e promissor campo de trabalho específico para as neoplasias da tireóide.

O presente estudo visou avaliar o padrão de expressão e a relevância biológica de um tipo de modificação de histona em tecidos de neoplasias tireoidianas e tireóides normais, através da técnica de imuno-histoquímica, com o intuito de esclarecer o papel dessa modificação no câncer de tireóide, especialmente nos CPT e, se possível, contribuir para o refinamento do processo de diagnóstico, mediante a identificação de possíveis marcadores específicos para essas neoplasias e para a agressividade das mesmas, com ênfase na comparação com achados histopatológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A glândula tireóide

2.1.1. Anatomia macroscópica e microscópica

Localizada na região cervical anterior inferior, no nível das vértebras C5-C7, a tireóide é uma glândula endócrina constituída por dois lobos unidos por um istmo, cujo peso varia entre 15 e 25g. Possui coloração variando entre vermelho e marrom, e é revestida por delicada cápsula de tecido conjuntivo frouxo. Seus lobos repousam sobre cada lado da traqueia e da laringe, enquanto o istmo se posiciona à frente das mesmas, abaixo do nível da cartilagem cricóide. Cada lobo tem um formato cônico, convexo na face anterior e nas laterais, com o ápice apontando para cima e para trás e a base dirigida para baixo e medialmente. Aproximadamente 40% dos indivíduos tem um lobo piramidal, um remanescente da porção inferior do ducto tireoglossos, que parte do istmo superiormente e pode estar conectado ao osso hióide por uma faixa de tecido conjuntivo fibroso (ROSAI, CARANGIU e DELELLIS, 1992; BIDDINGER, 2012).

A vascularização da tireóide é rica e deriva de ramos das artérias carótidas externas e subclávias, as artérias tireóideas superior e inferior, respectivamente. Sua drenagem venosa se dá pelas veias tireóideas superior, média e inferior, que drenam para as veias jugulares internas e braquiocefálicas. A drenagem linfática da tireóide é representada pelos linfonodos pericapsulares, pré-laríngeos, pré-traqueais, paratraqueais, jugulares internos, retrofaríngeos, retroesofágicos e os da cadeia do nervo laríngeo recorrente (ROSAI, CARANGIU e DELELLIS, 1992; CARANGIU, 2007).

A unidade fundamental da tireóide é o folículo, uma estrutura arredondada revestida por uma única camada de células epiteliais foliculares que repousa sobre uma membrana basal. No interior de cada folículo, encontra-se um material viscoso (colóide) constituído principalmente por proteínas secretadas pelas células foliculares, dentre elas a tireoglobulina, precursora dos hormônios tiroxina e triiodotironina (CARANGIU, 2007; BIDDINGER, 2012). A tireóide ainda possui um segundo tipo celular: as células C ou parafoliculares, localizadas no espaço interfolicular. Essas células derivam da crista neural e sintetizam calcitonina, hormônio que participa do metabolismo do cálcio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

2.2. Tumores malignos da tireóide

2.2.1. Incidência e epidemiologia

O câncer de tireóide é o tumor maligno endócrino mais comum e corresponde a 1 a 2% de todos os cânceres em países desenvolvidos. A incidência anual estimada é de 122 mil casos em todo o mundo. Nos Estados Unidos, segundo a *American Cancer Society*, das 65.630 malignidades endócrinas estimadas para este país em 2014, 62.980 teriam como sede a glândula tireóide (DELELLIS e WILLIAMS, 2004; SIEGEL, et al., 2014).

Na maioria dos países, incluindo o Brasil, os tumores malignos tireoidianos são de duas a quatro vezes mais comuns em mulheres do que em homens. No Brasil, para 2014, foram estimados 9.200 novos casos, a maioria deles (87,5%) em mulheres. Com relação à faixa etária, nota-se que a idade média no momento do diagnóstico é por volta dos 40 – 50 anos para carcinomas papilíferos, 50 anos para carcinomas foliculares e medulares e 60 anos para os tumores pouco diferenciados e indiferenciados. É raro que o câncer de tireóide acometa crianças (DELELLIS e WILLIAMS, 2004; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013).

Nas últimas décadas a incidência do câncer de tireóide vem aumentando em todo o mundo, especialmente às custas do carcinoma papilífero (o subtipo mais comum de câncer de tireóide) (KIM, et al., 2014; NIKIFOROV e OHORI, 2012; BROWN, SOUZA e COHEN, 2011). Entre os anos de 2006 e 2010, nos Estados Unidos, a neoplasia maligna que teve maior aumento na incidência foi a de tireóide (5,4 % e 6,5 % em homens e mulheres, respectivamente) (SHNEIDER e CHEN, 2013; SIEGEL, 2014).

Existem controvérsias sobre as causas desse aumento na incidência de tumores malignos tireoidianos. Suspeita-se que pode haver relação com as melhorias diagnósticas ocorridas nos últimos 30 anos, que geraram um importante aumento no diagnóstico de pequenos tumores assintomáticos (menores que 1cm) (DAVIES e WELCH, 2006). Porém, tumores de todos os tamanhos tem aumentado em frequência, como mostra o **Gráfico 1** (CHEN, JEMAL e WARD, 2009), e a mutação do gene BRAF tem sido identificada em um número cada vez maior de carcinomas papilíferos, o que aponta para uma possível contribuição de um fator ambiental no aumento da frequência destes tumores (NIKIFOROV e OHORI, 2012; SHNEIDER e CHEN; 2013).

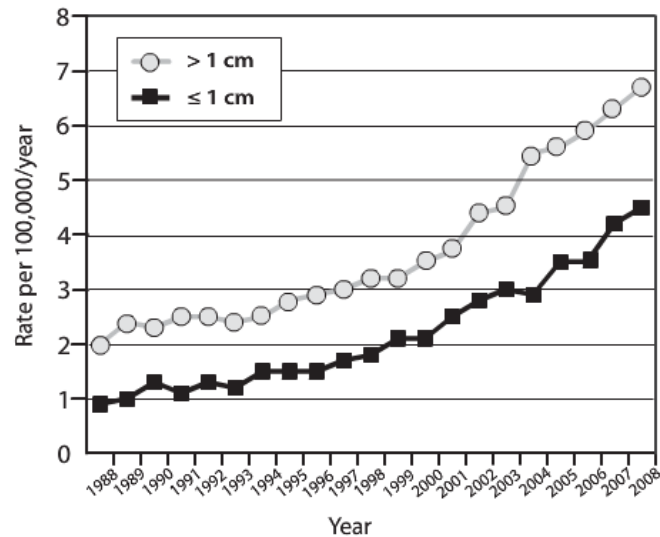


Gráfico 1 - Incidência do carcinoma papilífero de tireóide nos Estados Unidos entre 1988 e 2008, de acordo com o tamanho da lesão (NIKIFOROV e OHORI, 2012).

A mortalidade por câncer de tireóide é considerada baixa. Nos Estados Unidos, ocorre cerca de uma morte a cada 200.000 pessoas ao ano, em ambos os sexos. A taxa de sobrevivência em 5 anos é de 97% (NIKIFOROV e OHORI, 2012). A esse respeito, a taxa de mortalidade para grande parte dos cânceres sólidos vem diminuindo gradativamente ao longo dos anos. Entretanto, para o câncer de tireóide, a mortalidade tem se mantido estável nas últimas três décadas. Tal fato contrasta com o aumento do diagnóstico precoce desses tumores, o que chama novamente a atenção para a necessidade de maior compreensão sobre essa neoplasia, em todos os seus aspectos (CHEN, JEMAL e WARD, 2009; SIEGEL, et al., 2014).

2.2.2. Classificação

Classicamente, distinguem-se quatro grupos principais de carcinomas tireoidianos, tendo como base suas características microscópicas: papilíferos, foliculares, medulares e anaplásicos (indiferenciados). Essa divisão morfológica encontra respaldo em estudos moleculares, que mostram o envolvimento de diferentes grupos de genes para cada um dos quatro grupos de carcinoma (LEWINSKI et al., 2000; DELELLIS e WILLIAMS, 2004).

Dentre todos os nódulos tireoidianos, aproximadamente 95% são benignos. Em relação à frequência dos tumores malignos, 90% são carcinomas papilíferos, 10 a 15% são carcinomas foliculares, 5 a 10% são carcinomas medulares e menos que 5% são carcinomas

indiferenciados (anaplásicos) (MATIAS-GUIU et al., 2004; ORDONEZ et al., 2004; DELELLIS, 2006).

Os carcinomas papilíferos e foliculares são também chamados de carcinomas diferenciados da tireóide, pois ambos mostram estruturas similares às da tireóide normal. Juntos, perfazem mais que 90% das malignidades tireoidianas, o que ressalta a importância dessas duas entidades (GIMM e DRALLE, 2001). Compartilham também características demográficas e de comportamento biológico, tais como a prevalência no sexo feminino, a faixa etária média e a alta taxa de sobrevida (LIVOLSI et al., 2004; SIMÕES et al., 2004; BROWN, SOUZA e COHEN, 2011).

A maioria das neoplasias tireoidianas deriva das células epiteliais foliculares. Nesse grupo encontram-se os três tumores mais comuns: o adenoma folicular (benigno) e os carcinomas papilífero e folicular (malignos). Os tumores malignos pouco diferenciados, muito menos comuns, também derivam das células foliculares e acredita-se que são produto da desdiferenciação de tumores previamente bem diferenciados (WUNDERLICH et al., 2011; NIKIFOROV, 2012).

2.3. Carcinoma papilífero de tireóide

2.3.1. Considerações gerais

O carcinoma papilífero de tireóide (CPT) é a forma mais comum de câncer tireoidiano, correspondendo a 90% de todos os casos (DELELLIS, 2006). É atualmente definido como um tumor epitelial maligno com diferenciação de células foliculares, caracterizado por alterações nucleares típicas à microscopia (descritas adiante). Pode surgir na glândula tireóide ou em tecido tireoidiano ectópico (DELELLIS, 2006).

Apesar de maligno, seu comportamento é indolente e a taxa de sobrevida em 10 anos é de 93% (NIKIFOROV e OHORI, 2012). Metástases de CPT costumam acometer linfonodos regionais cervicais. A frequência de metástases cervicais detectadas pelo exame físico no momento do diagnóstico varia de 5 a 10%. Com o uso da ultrassonografia, essa frequência passa para 30% (SCHNEIDER e CHEN, 2013). Dados de centros onde o uso da dissecação de linfonodos cervicais é rotineiro referem metástases em mais de 90% dos pacientes operados (SAKORAFAS, SAMPANIS e SAFIOLEAS, 2009). Metástases à distância são incomuns

(1,73 a 8,4% dos casos) e costumam ocorrer principalmente em pulmões e ossos (NIKIFOROV e OHORI, 2012; CHRISOULIDOU et al., 2012).

2.3.2. Etiologia

Existe clara associação do CPT com a exposição à radiação ionizante, sendo esse o fator de risco mais conhecido. Situações como radioterapia para tratamento de condições malignas ou benignas e exposição acidental em acidentes nucleares tem demonstrado relação direta com o aumento de casos desse tumor (DELELLIS e WILLIAMS, 2004; WIERSINGA, 2007; TALLINI e ROSAI, 2011; NIKIFOROV e OHORI, 2012). A explicação para o efeito da radiação na tireóide reside, ao menos em parte, nos danos estruturais e funcionais causados aos folículos tireoidianos (LINDSAY, DAILEY e JONES, 2013). O hipotireoidismo resultante induziria um aumento na secreção do hormônio tireoestimulante pela hipófise. A ação deste hormônio sobre folículos já alterados pela radiação induziria subsequentemente a transformação neoplásica de suas células (LIVOLSI, 2011).

Também é conhecida associação entre a quantidade de iodo na dieta e câncer de tireóide, embora o papel exato do iodo na iniciação dos carcinomas tireoidianos ainda não seja conhecido (KONDO, EZZAT e ASA, 2006). Por exemplo, áreas onde a ingestão de iodo é considerada suficiente ou excessiva tem maior prevalência de CPT, inclusive com aumento da incidência de mutação em BRAF, enquanto áreas em que a população mostra deficiência na ingestão de iodo estão associadas à maior prevalência de carcinoma folicular de tireóide (CFT) (HORN-ROSS et al., 2001; KONDO, EZZAT e ASA, 2006; KNOBEL e MEDEIROS-NETO, 2007; GUAN et al., 2009; NIKIFOROV e OHORI, 2012; SCHNEIDER e CHEN, 2013). Porém, é difícil analisar isoladamente os efeitos do iodo da dieta, já que existe sempre a influência de outros fatores ambientais e de fatores genéticos na patogenia dessa neoplasia (SCHNEIDER e CHEN, 2013).

Regiões com atividade vulcânica, como certas áreas da Sicília, do Havaí e da Islândia, tem alta incidência de CPT. Na Catania, região de atividade vulcânica da Sicília, a água ingerida pela população contém quantidades aumentadas de certos elementos químicos como boro, ferro, vanádio e manganês. Nessa região, a incidência de CPT é maior que nas outras regiões da Sicília e a frequência da mutação do gene BRAF nesses tumores é também alta. Isso sugere a possibilidade de algum elemento químico com propriedades mutagênicas ser a causa da maior incidência de CPT nessas regiões (PELLEGRITI et al., 2009)

Cerca de 5 a 15% dos carcinomas diferenciados de tireóide (papilíferos e foliculares) relacionam-se à hereditariedade (NOSÉ, 2011). Filhos de indivíduos portadores de CPT tem quatro vezes mais chance de desenvolver o mesmo tumor (DELELLIS e WILLIAMS, 2004). Já foram caracterizadas síndromes de CPT familiar puro com ou sem oxifilia, CPT familiar com carcinoma papilar de células renais, e CPT familiar com bócio multinodular. Em alguns casos existe associação do CPT com certas síndromes clínicas, como polipose adenomatosa familiar, complexo de Carney tipo 1 e síndrome de Werner. Quando se está diante de um carcinoma papilífero multifocal ou bilateral, deve-se suspeitar de uma possível síndrome hereditária (NOSÉ, 2011; SCHNEIDER e CHEN, 2013).

Por último, o CPT tem uma associação significativa com tireoidite linfocítica. A presença de infiltrado inflamatório linfocitário em carcinomas tireoidianos é frequentemente observada, sugerindo a possível participação de fenômenos imunológicos na gênese tumoral. Embora seja conhecida a associação entre inflamação e câncer, para o CPT essa relação ainda carece de comprovação e estudos. Existe a possibilidade de que esses infiltrados inflamatórios sejam apenas uma reação à neoplasia, embora estudos moleculares recentes tenham evidenciado que a tireoidite linfocítica abriga lesões potencialmente precursoras de malignidade (KONDO, EZZAT e ASA, 2006; MAZOKOPAKIS et al. 2010).

2.3.3. Patologia

O CPT mostra usualmente um aspecto macroscópico típico: nódulo único mal delimitado, não capsulado, sólido, firme, de branco a pardo-claro, infiltrativo, com 1 a 3cm de diâmetro, ocasionalmente acompanhado por calcificações. Algumas variações podem ocorrer, tais como: tumores múltiplos, pequenos tumores menores que 1cm (microcarcinomas) ou grandes lesões maiores que 4cm; tumores com aparência puramente cística (raros) ou sólido-cística (frequentemente com projeções papilares dentro do cisto); tumores com consistência macia devido à presença de necrose (especialmente se anteriormente puncionados); lesões capsuladas e lesões com aspecto cicatricial (LIVOLSI, 2011; NIKIFOROV e OHORI, 2012).

Em termos microscópicos observa-se um fato interessante. Ao contrário de grande parte das neoplasias onde a arquitetura geral do tumor tem papel essencial no diagnóstico, no CPT os critérios mais importantes residem tão somente na aparência dos núcleos das células neoplásicas. A arquitetura tumoral tem pouca relevância para o diagnóstico e pode variar bastante, o que confere a esta entidade seus diferentes subtipos histológicos. Portanto, a mera

presença de papilas sem as alterações nucleares clássicas não permite o diagnóstico de CPT, assim como a ausência de papilas na presença das alterações nucleares definidoras não invalida esse diagnóstico (AL BRAHIM e ASA, 2006; BOERNER e ASA, 2010).

As alterações nucleares clássicas do CPT, necessárias ao seu diagnóstico histopatológico, fazem desse um diagnóstico basicamente citológico, o que reforça a importância da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) na propedêutica dessas lesões (BOERNER e ASA, 2010). Para o diagnóstico microscópico do CPT buscam-se os seguintes achados (**Figura 1**): 1. núcleos volumosos, alongados, sobrepostos uns aos outros; 2. limites nucleares irregulares; 3. cromatina clara com aspecto em “vidro-fosco” no centro e espessamento da membrana nuclear na periferia (núcleo similar aos olhos da personagem “pequena orfã Annie”, criada por Harold Gray em 1924, mostrada na **Figura 2**); 4. fendas nucleares decorrentes da observação, em duas dimensões, das irregularidades da carioteca; e 5. pseudoinclusões nucleares resultantes da observação, em duas dimensões, do acúmulo de citoplasma no interior das fendas nucleares. Encontrando-se tais alterações nucleares, tanto no esfregaço de punções quanto na biopsia, pode-se firmar o diagnóstico de CPT. Se além desses achados existir um padrão arquitetural papilar estaremos diante de um CPT clássico. Se o padrão for folicular ou qualquer outro, estaremos diante da variante folicular ou das demais variantes histológicas do CPT, descritas adiante (AL BRAHIM e ASA, 2006; LIVOLSI, 2011; NIKIFOROV e OHORI, 2012).

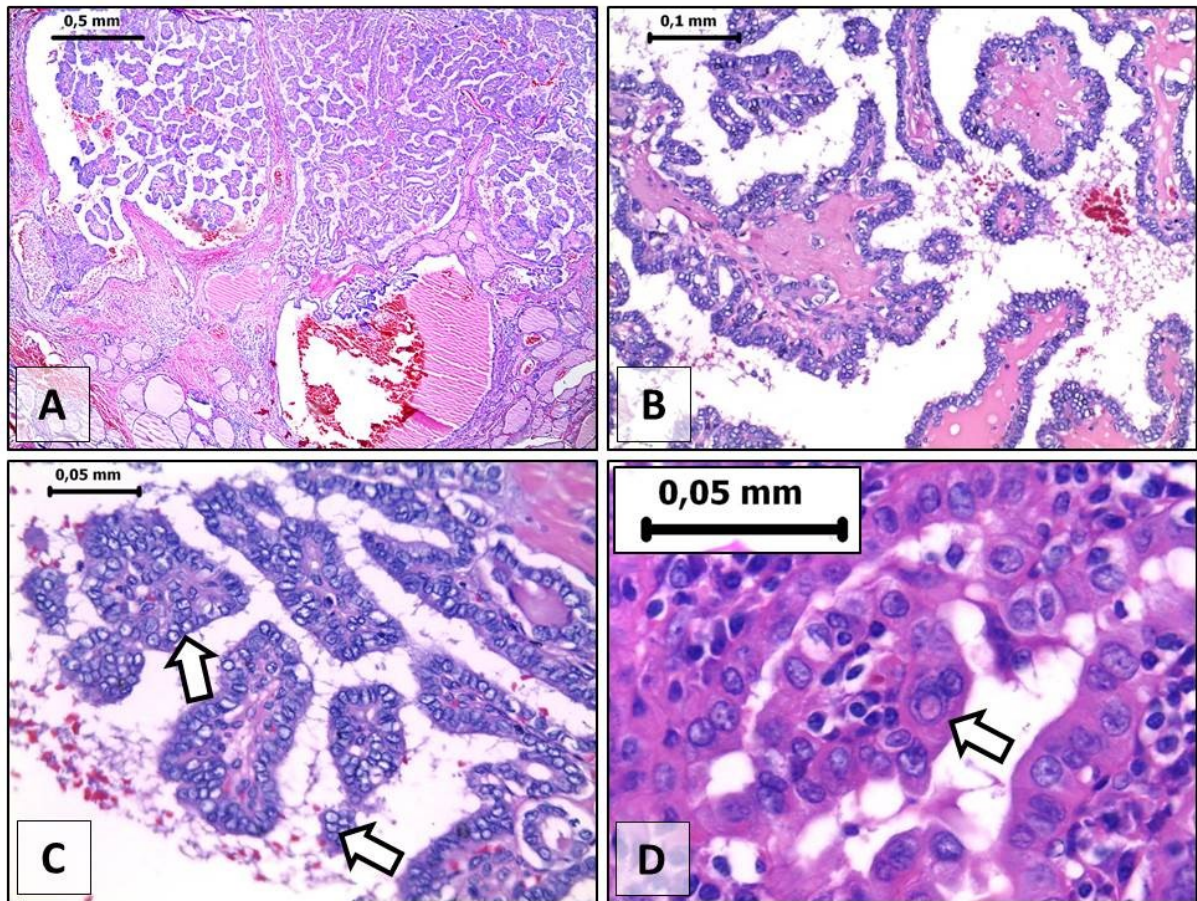


Figura 1 – Aspectos histopatológicos do CPT mostrando interface invasiva e não capsulada com tireóide não neoplásica (A, aumento de 40x), arquitetura papilar (B, aumento de 100x), núcleos de cromatina condensada na margem e aspecto de “olhos da órfã Annie” (C, indicados pelas setas, aumento de 400x), e pseudoinclusão nuclear (D, indicada pela seta, aumento de 400x). Coloração de hematoxilina e eosina.



Figura 2 – Personagem “pequena órfã Annie”, cujos olhos vazios se parecem ao aspecto distinto do núcleo do carcinoma papilífero de tireóide (CPT) que, ao contrário do hiperchromatismo que se observa comumente em neoplasias malignas, parece “vazio”. Curiosamente, o nome do cão que a acompanha, chamado de “Sandy” (“arenoso”, em Inglês) também é aplicável ao CPT, mas aos seus corpos psamomatosos (do Grego “psammos”, traduzível como “areia”, e “oma”, “tumor”). Fonte: <http://goo.gl/DpVnqI>, acesso em 25/01/2015.

Além das características nucleares acima, as células neoplásicas apresentam outras particularidades. Possuem formato cuboidal ou cilíndrico baixo e são mais volumosas que as células foliculares não neoplásicas. O citoplasma é eosinofílico, pálido e abundante. A organização das células pode seguir um padrão uniforme, com núcleos polarizados e alinhados, ou pode haver alguma desorganização e sobreposição celular (NIKIFOROV e OHORI, 2012).

O CPT possui algumas variantes, a saber: clássica, folicular, capsulada, oncocítica, macrofolicular, de células claras, Warthin-símile, de células colunares, de células altas, esclerosante difusa, sólida, cribriforme, com estroma fasciite-símile, com componente insular focal, com carcinoma escamoso ou mucoepidermóide, carcinoma papilífero e medular combinados e microcarcinomas (LIVOLSI et al., 2004).

O padrão arquitetural clássico predomina em dois terços dos CPT e consiste em projeções papilares compostas por um eixo fibrovascular recoberto por células epiteliais neoplásicas com as características nucleares anteriormente descritas. Essas papilas têm arranjos complexos, ramificados, por vezes lembrando os galhos de uma árvore. Algumas vezes o eixo fibrovascular das papilas pode conter um material mixóide, pode ser rico em linfócitos, ou ainda pode ter aspecto hialinizado. O colóide está comumente diminuído no CPT. Quando presente, tem coloração mais escurecida em relação ao colóide de áreas não neoplásicas e, em esfregaços de aspirados por agulha fina, tem um aspecto basofílico denso característico que lembra uma “goma de mascar”. Corpos psamomatosos, células gigantes multinucleadas derivadas de macrófagos, focos de metaplasia escamosa e infiltrados inflamatórios linfocíticos peritumorais também podem estar associados ao CPT (LIVOLSI et al., 2004; BOERNER e ASA, 2010; LIVOLSI, 2011; NIKIFOROV e OHORI, 2012).

A variante folicular do CPT (VFCPT) é particularmente importante pela sua semelhança com o adenoma folicular e com o CFT. É caracterizada por possuir arquitetura folicular com os achados nucleares típicos do CPT. Morfologicamente, estes tumores podem ser parcial ou completamente capsulados. Os que possuem cápsula completa podem ser confundidos com adenomas foliculares se totalmente confinados dentro da cápsula tumoral, ou com CFT quando associados a invasão capsular e, ou, vascular. A diferenciação entre VFCPT e adenomas e carcinomas foliculares reside basicamente na presença ou não das características nucleares típicas do CPT. Erros diagnósticos ocorrem mais comumente nos casos em que a VFCPT é completamente capsulada e apresenta achados nucleares característicos do CPT focais ao invés de difusos (BALOCH e LIVOLSI, 2000).

A variante oncocítica mostra células intensamente eosinofílicas e com citoplasmas granulosos, de arquitetura variada. Se capsulada, pode ser confundida com o adenoma oncocítico (ou de células de Hürthle). Quando existe um marcante infiltrado inflamatório permeando uma variante oncocítica com arquitetura papilar, semelhante ao tumor de Warthin das glândulas salivares, a variante é chamada Warthin-símile. A variante de células claras tem predominância de células claras, com algumas células oncocíticas de permeio. A variante macrofolicular é provavelmente a mais rara e, pela predominância de macrofoliculos, pode ser confundida com nódulos hiperplásicos ou adenomas macrofoliculares benignos. As variantes de células altas, de células colunares, esclerosante difusa, sólida e com componente insular focal são as que tem comportamento mais agressivo (ROSAI, CARANGIU e DELELLIS, 1992; LIVOLSI et al., 2004; AL BRAHIM e ASA, 2006; SILVER, 2011).

2.3.4. Desafios no diagnóstico histopatológico dos carcinomas diferenciados de tireóide

A princípio pode parecer fácil o diagnóstico histopatológico do CPT. Na verdade, quando todos os achados clássicos estão presentes e evidentes, o diagnóstico é inequívoco. Porém, quando apenas alguns critérios nucleares estão presentes, quando as alterações nucleares são duvidosas, quando os achados nucleares são observados apenas focalmente, quando há outras alterações concomitantes (tireoidites, bócio) ou ainda quando o contexto histopatológico como um todo não favorece o diagnóstico de neoplasia, o diagnóstico pode ser desafiador (ELSHEIKH et al., 2008; LIVOLSI, 2011).

Como já foi dito anteriormente, o CPT e o CFT perfazem mais de 90% dos tumores malignos tireoidianos e são considerados carcinomas diferenciados da tireóide (BROWN, SOUZA e COHEN, 2011). Além de algumas semelhanças quanto à epidemiologia e prognóstico, existem semelhanças cito-histopatológicas entre eles, o que pode dificultar bastante o diagnóstico diferencial. Ainda, deve-se considerar que o adenoma folicular, uma lesão benigna, pode também compartilhar semelhanças cito-histopatológicas com o CPT e o CFT (LIVOLSI et al., 2004; SIMÕES et al., 2004; AL BRAHIM e ASA, 2006)

Quando se está diante da VFCPT, especialmente em lesões capsuladas e com os achados nucleares diagnósticos imperfeitos e focais, o diagnóstico citológico e histológico diferencial deste com o CFT e o adenoma folicular pode ser muito difícil (BALOCH e LIVOLSI, 2000; HIROKAWA et al., 2002; ELSHEIKH et al., 2008). Todos têm arquitetura folicular e todos podem ser capsulados. Se a cápsula não mostra invasão, há o risco de se diagnosticar como

adenoma folicular um CPT (variante folicular), o que pode ser desastroso quando se leva em consideração que alguns CPT podem ser agressivos e ter prognóstico ruim. Estudos mostram que, nesses casos, a discordância diagnóstica, mesmo entre patologistas especialistas em tireóide, é considerável (HIROKAWA et al., 2002; ELSHEIKH et al., 2008). Estudos imunohistoquímicos e moleculares ainda não conseguiram resolver plenamente essa questão (NASR et al., 2006; FISHER e ASA, 2008; YIP, 2010; GROGAN, MITMAKER e CLARK, 2012). Portanto, a descoberta de um marcador ou técnica que diferencie essas lesões seria de grande utilidade para o diagnóstico e tratamento do câncer de tireóide (AL BRAHIM e ASA, 2006; LIVOLSI, 2011; GROGAN, MITMAKER e CLARK, 2012).

2.3.5. Fatores prognósticos dos carcinomas diferenciados da tireóide

A sobrevida dos pacientes com CPT é, de forma geral, excelente. A taxa de sobrevivência em dez anos é de 90%, sendo que para pacientes jovens chega a 98% (LIVOLSI et al., 2004). Entretanto, uma minoria de casos, usualmente relacionados a certos parâmetros clínicos e histopatológicos, pode apresentar comportamento mais agressivo, contrariando as expectativas. Esses casos comumente necessitam de abordagem terapêutica ampla para erradicar totalmente a doença. Por esse motivo, a existência de indicadores que possam prever o comportamento do CPT é essencial (BROWN, SOUZA e COHEN, 2011).

Os principais fatores preditores de pior prognóstico são: idade superior a 45 anos, sexo masculino, tumor maior que 4cm, extensão tumoral extra-tireoidiana, ressecção incompleta do tumor e metástases à distância. Multifocalidade e invasão vascular sanguínea parecem influenciar no prognóstico dos pacientes, porém em menor grau (ROSAI, CARANGIU e DELELLIS, 1992; DEAN e HAY, 2000; LEWINSKI et al., 2000; QU et al., 2014). Metástases para linfonodos regionais são comuns no CPT e parecem ter mais impacto na chance de recorrência local do que na sobrevida (SCHNEIDER e CHEN, 2013), porém nas estratificações de risco de óbito preconizadas pela *American Thyroid Association* e pela *European Thyroid Association*, a presença de metástases para linfonodos regionais classifica o paciente nas categorias de risco intermediário e alto para óbito, respectivamente (PACINI et al., 2012). Na classificação clínica de risco mais usada, TNM, metástase para linfonodos do compartimento lateral (N1b), doença extratireoidiana maciça (T4) e metástases à distância (M1) são fatores independentes correlacionados com mau prognóstico (LUNDGREN et al., 2005; GIRARDI, BARRA e ZETTLER, 2013).

A avaliação histopatológica, dentro dos parâmetros preditores de mau prognóstico citados, ganha evidente destaque. Vários desses parâmetros só são verdadeiramente avaliados após minuciosa análise microscópica. Tamanho, invasão extratireoidiana, invasão vascular, presença de metástases para linfonodos, subtipo histológico, multifocalidade e a definição sobre a ressecção completa ou incompleta do tumor (margens cirúrgicas) são importantes fatores para o estadiamento e a avaliação do prognóstico dos pacientes (DEAN e HAY, 2000).

Certas variantes histopatológicas do CPT estão relacionadas a pior prognóstico, tais como as variantes de células altas, de células colunares, esclerosante difusa, trabecular/sólida e insular. No entanto, são poucas as evidências de que o subtipo histológico do tumor é em si um preditor independente de comportamento tumoral. Na verdade, essas variantes tendem a estar associadas a características reconhecidas por outros sistemas de estadiamento como relacionados a pior prognóstico, incluindo propagação extracapsular, tamanho do tumor e presença de metástases à distância (SILVER et al., 2011; GIRARDI, BARRA e ZETTLER, 2013).

Akslen e LiVolsi (2000) relataram uma série de 128 pacientes com CPT e descobriram que, embora certas variantes histológicas pareçam ser fatores significativos na análise da sobrevida, apenas o tamanho do tumor e grau histológico permaneceram como preditores independentes e significativos de morte. Nesse estudo, o grau histológico foi analisado através da presença ou ausência de marcante atipia nuclear, necrose tumoral ou invasão vascular.

Recentemente, a positividade para a mutação BRAF foi associada a um pior prognóstico (XING, 2010; SILVER et al., 2011; SCHNEIDER e CHEN, 2013), porém em 2013 um estudo com 429 pacientes portadores de CPT não demonstrou associação entre a mutação e os indicadores prognósticos negativos do CPT, sugerindo que são necessários mais estudos para avaliar o impacto prognóstico dessa mutação (GOUVEIA et al., 2013).

2.4. Alterações epigenéticas

Muito se tem falado sobre “epigenética”, termo que se refere ao estudo das alterações na expressão gênica que ocorrem sem modificações na sequência do DNA e que podem passar às células-filhas durante a divisão celular. O papel dos processos epigenéticos reside na modulação da expressão gênica através da regulação da estrutura do DNA, sendo assim uma ponte entre genótipo e fenótipo. O estado epigenético de um organismo determina, portanto,

como um único genoma irá se expressar em seus diferentes tipos celulares e em seus vários estágios de desenvolvimento (TABY e ISSA 2010; HERCEG e MURR, 2011; CATALANO FORTUNATI e BOCCUZZI, 2012).

Em outras palavras, a epigenética se refere basicamente à variabilidade na expressão gênica. O melhor exemplo da epigenética é a diferenciação celular, na qual um único genoma é capaz de originar vários tipos celulares com diferentes papéis fisiológicos num mesmo organismo. Nas últimas décadas cresceu o interesse científico a respeito das alterações de processos epigenéticos desde que foi observado seu papel no surgimento de alguns tumores malignos (FEINBERG e TYCKO, 2004). As principais alterações epigenéticas estudadas são: metilação do DNA, modificações de histonas e RNAs não codificantes (GOLDBERG, ALLIS e BERNSTEIN, 2007; TABY e ISSA, 2010).

2.4.1. As histonas

A informação genética de uma célula humana está contida em moléculas de DNA que medem juntas cerca de 2m de comprimento. Toda essa estrutura está contida em um núcleo que corresponde praticamente à milionésima parte desse comprimento. Essa impressionante compactação só é possível graças a associação das longas moléculas de DNA com proteínas básicas chamadas histonas (LUGER, 2001; KAMAKAKA e BIGGINS, 2005; TARK-DAME, VAN DRIEL e HEERMANN, 2011).

As histonas são proteínas relativamente pequenas, com peso molecular entre 11 e 23KDa e compostas por 102 a 220 aminoácidos. São cinco tipos principais de proteínas, denominadas H1, H2A, H2B, H3 e H4. Essas proteínas são responsáveis pelo nível mais básico de compactação da cromatina: o nucleossomo (ALBERTS et al., 2008; MAESHIMA, HIHARA e ELTSOV, 2010).

O nucleossomo é a unidade básica de organização da cromatina, sendo um complexo DNA-proteína formado por um octâmero de histonas em forma de disco em torno do qual a dupla hélice de DNA se enrola. O octâmero do nucleossomo é constituído por um complexo de oito proteínas histonas – duas moléculas de cada tipo: H2A, H2B, H3 e H4 (FISCHLE, WANG e ALLIS, 2003).

As histonas H2A, H2B, H3 e H4 são também chamadas de histonas *core* (“histonas centrais”). Apesar de algumas diferenças nas suas sequências de aminoácidos, elas

compartilham um mesmo motivo estrutural, denominado *dobramento de histona*, além de possuírem um longo segmento N-terminal. Os *dobramentos de histona* são sequências proteicas altamente conservadas entre as espécies e constituídas por três sequências de α -hélices conectadas por duas sequências filamentosas em alça (ALVA, 2007).

As sequências de α -hélice dos dobramentos de histona se unem e suas sequências filamentosas se justapõem em pontes paralelas, formando assim os dímeros H2A-H2B e H3-H4. Os dímeros H3-H4 se unem para formar tetrâmeros. Os tetrâmeros H3-H4, por sua vez, se unem a dois dímeros H2A-H2B para formar a estrutura compacta do octâmero (RAMAKRISHNAN, 1997; LUGER, 2001; PEPENELLA, MURPHY e HAYES, 2014).

As histonas H3 e H4 formam o tetrâmero central, enquanto as histonas H2A e H2B formam dois dímeros de cada lado do tetrâmero. As cadeias N-terminais flexíveis das histonas *core* estendem-se para fora do nucleossomo e estão assim mais expostas a modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação, fosforilação, dentre outras (FISCHLE, WANG e ALLIS, 2003; CHERVONA e COSTA, 2012).

As caudas N-terminais das histonas são muito menos conservadas que os *dobramentos de histona* e podem variar entre diferentes organismos. Existem ainda algumas variantes especializadas de histonas *core* produzidas pelos seres eucariontes, como por exemplo as histonas H3.3 e CENP-A, que podem substituir a histona H3. Essas variantes, juntamente com as modificações covalentes que as caudas N-terminais podem sofrer, tornam possíveis variações na estrutura da cromatina que são necessárias às complexas funções exercidas pelo DNA (KAMAKAKA e BIGGINS, 2005; ALBERTS et al., 2008)

Cada nucleossomo possui cerca de 147 pares de bases nucleotídicas enoveladas em aproximadamente 1,65 volta no octâmero de histonas (LI, 2007; LUGER, 2011); outros pares de bases encontram-se num segmento do DNA que une um nucleossomo ao outro, denominado DNA de ligação. Essa estrutura básica formada por uma sequência de nucleossomos conectados pelo DNA de ligação, no formato de um “colar de contas” é a forma mais simples de compactação da cromatina: a chamada fibra de 11nm. Uma quinta histona, H1, liga-se ao nucleossomo, auxiliando na organização da cromatina em uma estrutura de maior ordem: a fibra de 30nm. A estrutura exata dessa fibra ainda é discutida, mas as principais teorias apontam para uma organização num formato de solenoide ou de zigue-zague (LUGER, 2001; MAESHIMA, HIHARA e ELTSOV, 2010; PEPENELLA, MURPHY e HAYES, 2014).

As histonas H1 são compostas por um domínio globular contendo 90 aminoácidos, uma longa cauda C-terminal e uma curta cauda N-terminal. Como já foi dito, a histona H1, também chamada de histona de ligação, não participa do octâmero do nucleossomo, mas tem papel importante na compactação da cromatina, pois se associa ao DNA de ligação que chega e deixa o centro do nucleossomo, causando um entrelaçamento entre esses segmentos para formar a fibra de 30nm. A ligação da histona H1 com o nucleossomo é dinâmica, associando-se e dissociando-se do DNA de acordo com as necessidades de compactação ou descompactação da cromatina (KHORASANIZADEH, 2004; BUSTIN, CATEZ e LIM, 2005).

A interface DNA-histonas mostra extensas interações, com cerca de 142 ligações de hidrogênio entre essas duas partes em cada nucleossomo, além de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, que garantem o perfeito encaixe entre as estruturas (ALBERTS et al., 2008). Devido a essas interações, o nucleossomo é uma das estruturas DNA-proteína mais estáveis sob condições fisiológicas. Entretanto, nem por isso é uma estrutura estática; ao contrário, possui propriedades dinâmicas reguladas por diversos complexos protéicos (LI, CAREY e WORKMAN, 2007). Por exemplo, o octâmetro de histonas pode preferir assumir uma posição translacional ou rotacional particular num dado momento. Isso significa que é possível proteger ou expor determinadas sequências de DNA de acordo com as necessidades da célula (LUGER, 2001).

2.4.2. Modificações pós-traducionais de histonas

A cromatina é organizada em domínios distintos, eucromatina e heterocromatina, que são definidos pelo nível de compactação e funções genômicas associadas. A eucromatina tem compactação relativamente frouxa e é tipicamente permissiva à transcrição, enquanto heterocromatina é mais condensada e transcricionalmente repressiva. O nível de organização e compactação da cromatina é influenciado por inúmeros fatores, dentre eles, as modificações pós-traducionais de histonas (MPTH), que tem sido alvo de numerosos estudos nos últimos anos (SANTOS-ROSA e CALDAS, 2005; BAYLIN e JONES, 2011; ROTHBART e STRAHL, 2014).

Um conjunto diversificado de MPTH pode ocorrer na cromatina para regular a sua estrutura e o acesso ao DNA. Tais modificações podem ocorrer em diversos sítios de suas caudas N-terminais e C-terminais, bem como na sua estrutura globular, e existem pelo menos 80

diferentes sítios de modificações já reportados (COHEN et al., 2011). Dentre os tipos de MPTH, oito são mais bem estudados: acetilação, metilação, deiminação, fosforilação, ubiquitinação, sumoylação, ribosilação de ADP e isomerização de prolina. Pelo grande número de sítios passíveis de todas essas modificações, as MPTH permitem grande flexibilidade na regulação dinâmica da cromatina (TABY e ISSA, 2010; RUSSO et al., 2011).

A grosso modo, existem basicamente dois mecanismos através dos quais as MPTH podem regular as funções da cromatina. O primeiro baseia-se na ruptura de interações nucleossomo-nucleossomo e DNA-histonas e visa regular o acesso a determinadas regiões do DNA. É o caso, por exemplo, da acetilação de histonas, que enfraquece a interação entre estas e o DNA, tornando-o mais acessível a fatores reguladores. O segundo mecanismo ocorre através do recrutamento de proteínas não-histônicas (enzimas) que modulam as respostas celulares à jusante (COHEN et al., 2011; IZZO e SCHNEIDER, 2011; GURARD-LEVIN e ALMOUZNI, 2014; ROTHBART e STRAHL, 2014).

Analisando esses mecanismos, Strahl e Allis (2000) propuseram a existência de um “código de histonas”. Segundo esses autores, a natureza combinatória das inúmeras MPTH possíveis revelaria um “código” ou “linguagem”. Esse código seria “lido” por proteínas não-histônicas efetoras com funções enzimáticas capazes de modificar a cromatina, o que resultaria num determinado *status* funcional do DNA e determinaria as respostas celulares subsequentes. Sob esse ponto de vista, a quantidade de informações do código genético não se limitaria apenas à variadíssima sequência de nucleotídeos do DNA, mas sim seria enormemente ampliada pela imensa gama de modificações de histonas possíveis (STRAHL e ALLIS, 2000; COHEN et al., 2011; JENUWEIN e ALLIS, 2001).

O estado de modificações de uma histona num dado momento é controlado pela adição ou remoção dessas modificações por enzimas específicas (CHERVONA e COSTA, 2012). Fazendo analogia a um código qualquer, o “código de histonas” também seria “escrito”, “apagado” e “lido”. A compreensão a respeito do funcionamento das MPTH deu um salto após a descoberta dessas enzimas, que incorporam (“escrevem”), removem (“apagam”), e se ligam (“lêem”) a essas modificações (BARTH e IMHOF, 2010). Continuamente surgem evidências de que os processos regulados por essas enzimas contribuem para o início e desenvolvimento do câncer em humanos (CHI, ALLIS e WANG, 2010).

As modificações mais bem estudadas até o momento são a acetilação, a metilação e a fosforilação. A acetilação de histonas é um processo reversível que ocorre pela transferência de um grupo acetila proveniente de moléculas de acetil-CoA para resíduos de lisina na cadeia

N-terminal das histonas *core*, reação essa catalisada por enzimas denominadas histonas acetiltransferases (HAT). A desacetilação é catalisada pelas desacetilases de histonas (HDAC). Conforme mencionado anteriormente, a acetilação de histonas enfraquece as interações DNA-histonas, levando a um estado de cromatina descompactada e, portanto, transcricionalmente ativa. Aparentemente, o enfraquecimento das interações DNA-histonas ocorre porque a acetilação neutraliza a carga elétrica das histonas. Uma atividade desregulada das HAT pode levar à hiperacetilação das histonas, o que pode afetar a replicação e o reparo de DNA (COHEN et al., 2011; IZZO e SCHNEIDER, 2011; CHERVONA e COSTA, 2012).

A metilação de histonas é também um processo reversível. Ocorre pela adição covalente de um grupo metil proveniente de S-adenosilmetionina a átomos de hidrogênio da N-terminal dos resíduos de arginina e lisina. Esta reação é catalisada pelas histonas-metiltransferases. A metilação de histonas pode estar relacionada à ativação, prolongamento ou repressão da expressão gênica. A desmetilação é catalisada pelas enzimas histonas-desmetilases (KOUZARIDES, 2007; COHEN et al., 2011).

A fosforilação de histonas é uma alteração transitória que pode ser induzida por sinais extracelulares, dano ao DNA e iniciação da mitose. Tem como principal substrato as serinas, treoninas e tirosinas (SAWICKA e SEISER, 2014). As enzimas quinases ligam covalentemente um grupo fosfato proveniente de um nucleosídeo trifosfato ao aminoácido aceptor, enquanto as fosfatases o removem (THOMPSON et al., 2013). A fosforilação de histonas regula processos celulares cruciais incluindo transcrição, reparo de DNA, condensação dos cromossomos e apoptose (LEE et al., 2013).

Em particular, a fosforilação da serina 10 da histona H3 (H3S10) tem sido estudada extensivamente em vários organismos devido ao seu importante papel na regulação dinâmica da cromatina. Seus efeitos mais conhecidos são curiosamente opostos, ora se relacionando à condensação da cromatina, ora a estados de cromatina relaxada e transcricionalmente ativa (HE e LEHMING, 2003; SANTOS-ROSA e CALDAS, 2005; JOHANSEN e JOHANSEN, 2006)

De acordo com observações de estudos *in vivo*, H3S10 está associada a condensação e segregação cromossômica de células em mitose. Uma intensa fosforilação de H3S10 inicia-se no período G2 tardio, na cromatina peri-centromérica. Com o avanço da divisão celular, ela se espalha ao longo dos cromossomos e se completa na prófase. No fim da mitose, H3S10 está completamente desfosforilada (PRINGENT e DIMITROV, 2003; JOHANSEN e JOHANSEN, 2006).

Essa forte associação entre H3S10p e condensação cromossômica na mitose levou alguns autores a sugerir essa modificação de histona como um marcador exclusivo de proliferação celular, especialmente útil na contagem de mitoses em neoplasias quando utilizada a técnica de imuno-histoquímica (FUKUSHIMA et al., 2009; VERAS et al., 2009; TSUTA, et al., 2011; LADSTEIN et al., 2012). Entretanto, já foi relatado que H3S10p também está aumentada nas células apoptóticas, o que vai contra a hipótese de que essa modificação apenas indique proliferação celular (HENDZEL et al., 1998). Por outro lado, H3S10 fosforilada (H3S10p) também está associada a um estado de cromatina relaxada e à ativação de certos genes durante a interfase, como por exemplo os proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun* (NOWAK e CORCES, 2000; LABRADOR e CORCES, 2002; CHOI et al., 2005). Portanto, deduz-se que H3S10p não deve ser uma marca exclusiva de proliferação celular, mas também pode estar presente em células interfásicas que possuam certos genes transcricionalmente ativos. Para corroborar com esse achado vários estudos mostram aumento da fosforilação de H3S10 em certos tumores malignos humanos, como os tumores de cérebro, mama, próstata, bexiga, nasofaringe, fígado, cólon e reto (OTA et al., 2002; SISTAYANARAIN et al., 2006; LUO et al., 2011; CHA et al., 2015; LI et al., 2013; FAGAN-SOLIS et al., 2014; NOWAK et al., 2014; PACAUD et al., 2015).

A marcante participação de H3S10p na condensação e segregação dos cromossomos na mitose (JOHANSEN e JOHANSEN, 2006; PRINGENT e DIMITROV, 2003), fase do ciclo celular mais susceptível a agentes químicos e físicos, o achado de altos níveis dessa modificação em diversos tipos de cânceres humanos (OTA et al., 2002; SISTAYANARAIN et al., 2006; LUO et al., 2011; CHA et al., 2015; LI et al., 2013; FAGAN-SOLIS et al., 2014; NOWAK et al., 2014; PACAUD et al., 2015) e o seu envolvimento na ativação gênica, incluindo proto-oncogenes (NOWAK e CORCES, 2000; LABRADOR e CORCES, 2002; CHOI et al., 2005) tem motivado vários estudos buscando compreender melhor a participação de H3S10 na carcinogênese.

2.4.3. Envolvimento de H3S10 fosforilada em neoplasias

Alguns estudos têm demonstrado que a fosforilação de H3S10 é uma etapa crucial no processo de transformação neoplásica (LI, 2013; KIM, 2008; CHOI et al., 2005). O nível de H3S10p está aumentado em fibroblastos oncogene-transformados de murinos e em linhagens celulares de cânceres pancreáticos humanos, existindo em ambos os casos evidências da

ativação persistente da via *Ras*-MAPK (ESPINO et al., 2009; ILEANA e DAVIE, 2002; CHADEE et al., 1999). Células de câncer de mama humano expostas a álcool mostraram aumento na expressão do oncogene *Ros1*, com conseqüente aumento nos níveis H3S10p através da ativação da via MAPK (LEE et al., 2013). Níveis aumentados de fosforilação de H3S10 também já foram descritos em tumores humanos de cérebro, mama, próstata, bexiga, nasofaringe, fígado, cólon e reto (OTA et al., 2002; SISTAYANARAIN et al., 2006; LUO et al., 2011; CHA et al., 2015; LI et al., 2013; FAGAN-SOLIS et al., 2014; NOWAK et al., 2014; PACAUD et al., 2015).

Alguns carcinógenos ambientais também já foram implicados na expressão aberrante de H3S10p, tais como arsênico, níquel, tabaco e exposição a raios UVB (KE et al., 2008; ZHONG et al., 2013; IBUKI et al., 2014). Carcinomas de mama induzidos por radiação ionizante e por estrógeno em ratos demonstraram níveis aumentados de H3S10p (KUTANZI e KOVALCHUK, 2013), assim como células de hepatocarcinoma de camundongos induzidas por dietilnitrosamina (ZHONG et al., 2013).

Níveis aumentados de H3S10p frequentemente se relacionam a alterações dos componentes da via MAPK. *Ras* é um dos oncogenes mutados mais frequentemente encontrados em tumores (ESPINO et al., 2009). Estimulação da via de transdução de sinal *Ras*-MAPK (*Ras-Raf-Mek-Erk*) resulta na fosforilação de H3S10 (STRELKOV e DAVIE, 2002). Nos mamíferos, a via de sinalização de *Erk* é a mais estudada das vias MAPK. A regulação inadequada da via *Erk* está relacionada à transformação neoplásica (LEE et al., 2011). A enzima *Erk* fosforilada ativa a enzima MSK1, uma serina-treonina-proteína-quinase que tem como substrato a serina 10 da histona H3. Estudos recentes demonstraram que H3S10 fosforilada e MSK1 são cruciais na transformação neoplásica (CHOI et al., 2005; KIM, 2008). Além disso, a enzima Aurora B, uma proteína quinase que também fosforila a serina 10 de H3, foi detectada em altos níveis em vários cânceres humanos (LEE et al., 2011). O agente anti-tumoral escamocina, promove a inibição das enzimas Aurora B e MSK1, o que leva a diminuição dos níveis de H3S10p, conforme foi observado em linhagens celulares de câncer de bexiga, fígado e cólon (LEE et al., 2011). Por último, H3S10p também foi relacionada a indução dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun* (CHOI et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obter dados que contribuam para o esclarecimento do papel da forma fosforilada de H3S10p no câncer de tireóide, especialmente nos carcinomas papilíferos. Se possível, contribuir para melhorias no diagnóstico e na avaliação do prognóstico, mediante a identificação de possíveis marcadores específicos, com ênfase na comparação com achados histopatológicos.

3.2. Objetivos específicos

1. Comparar a reatividade de H3S10p entre os diferentes tumores avaliados, comparados também com amostras de tireóide não neoplásica, com a finalidade de esclarecer diferenças de comportamento biológico e favorecer o diagnóstico diferencial.
2. Comparar a reatividade de H3S10p entre carcinomas papilíferos primários que não apresentaram metástases regionais e carcinomas papilíferos primários metastatizantes, com a finalidade de esclarecer diferenças de comportamento biológico e identificar casos potencialmente mais agressivos.
3. Comparar a reatividade de H3S10p entre carcinomas papilíferos quanto a achados histopatológicos relevantes para o diagnóstico e prognóstico desse tumor.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo tem caráter retrospectivo e analítico, com uma 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 carcinomas papilíferos. Tendo em vista a investigação de possíveis associações com achados histopatológicos 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 tireóide, foram incluídos casos de adenomas foliculares (neoplasia tireoidiana benigna), carcinomas foliculares, carcinomas oncocíticos (neoplasias tireoidianas malignas relevantes por sua frequência), ou de carcinomas medulares da tireóide (neoplasia maligna reconhecida pela maior agressividade quando comparada aos demais carcinomas tireoidianos).

O rastreamento inicial desses casos foi feito por consulta aos registros de tireoidectomias executadas pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas de Uberlândia 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 tireóide. 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 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 10, com o software BioEstat 5.0.

Além da confirmação do diagnóstico e da seleção dos casos, a avaliação dos registros de exame histopatológico e das lâminas disponíveis para análise verificou também a presença nos casos selecionados de determinadas características que potencialmente estão relacionadas a comportamento biológico mais agressivo e, conseqüentemente, pior prognóstico. São eles: multifocalidade, cápsula fibrosa, necrose, mitoses, invasão vascular, invasão extratireoidiana, comprometimento de margens cirúrgicas e presença de metástases linfonodais (COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS, 2009). Essa avaliação ficou restrita aos carcinomas papilíferos.

Concomitantemente à revisão histológica, os casos selecionados tiveram suas informações demográficas (sexo e idade) extraídas dos registros hospitalares dos pacientes.

4.2. Matrizes teciduais

Para estudo imuno-histoquímico, foram elaboradas matrizes teciduais pela técnica de TMA (*tissue microarray*), segundo descrito por Nocito e Kononen et al (2001) e exposto a seguir. Nos casos selecionados, a patologista marcou nas lâminas histológicas a área tecidual onde se encontravam as características mais típicas de cada tumor e a menor quantidade de artefatos. A área assim demarcada foi utilizada como gabarito para a confecção dos blocos de TMA.

Com base nas áreas marcadas nas lâminas, foram extraídos cilindros de 0,6mm de espessura dos blocos doadores, os quais foram transferidos para o bloco receptor. Nesse bloco, as amostras eram dispostas e identificadas segundo coordenadas alfanuméricas de acordo com as linhas e colunas, tendo como referência amostras de tecido hepático dispostas em um dos cantos do bloco.

Após depósito dos cilindros doadores no bloco receptor, o mesmo foi aquecido, visando à consolidação. Após resfriamento, foram obtidos cortes de 3µm de espessura de cada matriz, depositados em lâminas recobertas com 3-aminopropiltriétoxisilano, 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*) 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 o anticorpo primários produzido para detecção de H3S10p (ABCAM, Cambridge, Reino Unido), diluído a 1:100. 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'tetrahidrocloro 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 carcinoma cervical uterino para o controle positivo e negativo, sendo que para o controle negativo houve a omissão do anticorpo primário.

4.4. Análise da imunomarcção

As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas em microscópio de luz convencional (Leica DM750). Essa análise foi feita de forma independente por uma avaliadora com experiência em análises imuno-histoquímicas (Juliana Mota Pereira).

Foram utilizados como critérios de análise a presença ou não de reatividade, a intensidade de reação (fraca, moderada ou forte), e a proporção de células reativas (em seis intervalos). Em seguida, um índice composto, denominado *Quickscore* (QS), foi calculado pela multiplicação dos valores de intensidade de reação / *staining* (IS) e de proporção de células reativas / positivas (PPC), segundo metodologia previamente descrita (DETRE, JOTTI e DOWSETT, 1995). As classes e os valores atribuídos a cada uma delas para cálculo do QS são apresentados no **Quadro 1**.

Quadro 1– Parâmetros, classes e valores utilizados para avaliação das reações imuno-histoquímicas (DETRE, JOTTI e DOWSETT, 1995).

Parâmetro	Classes e valores						
	0	1	2	3	4	5	6
Proporção de células neoplásicas positivas	Sem reatividade	0 a 4%	5 a 19%	20 a 39%	40 a 59%	60 a 69%	80 a 100%
Intensidade de coloração	Sem reatividade	Fraca	Moderada	Intensa	-	-	-

4.5. Tabulação de resultados e análise estatística

Considerando os intervalos não contínuos da possível distribuição dos valores finais do índice Quickscore (0 a 6, 8 a 10, 12, 15, e 18), apenas testes estatísticos não paramétricos foram utilizados neste estudo. Comparações entre valores foram realizadas com os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis (com pós-teste de Dunn). Análise de correlação foi feita com o teste de Spearman. Significância estatística foi atribuída para valores de *p* menores que 0,05.

5. RESULTADOS

Um total de 85 amostras teciduais foram selecionadas, cuja distribuição e respectivos dados demográficos dos pacientes são detalhados na **Tabela 1**. Verificou-se um predomínio de mulheres adultas, de carcinomas papilíferos dentre as neoplasias malignas, e um elevado número de carcinomas papilíferos metastatizantes para linfonodos regionais (38% desses tumores).

Tabela 1 – Distribuição dos casos selecionados, segundo natureza das amostras biológicas, tipo histológico dos tumores, sexo e idade dos pacientes.

Grupo	N	Sexo (M:H)	Idade ($\bar{x} \pm DP$)
Tireóide normal	14	-	-
Adenomas	10	5:1	46,6 ± 13,7
Neoplasias malignas	61	5,5:1	43,3 ± 17,6
Carcinoma papilífero	48	5,1:1	42,0 ± 16,8
<i>Clássico</i>	34	5,8:1	40,8 ± 17,2
<i>(não metastatizante)</i>	21	6,0:1	46,2 ± 15,1
<i>(metastatizante*)</i>	13	5,5:1	32,9 ± 19,4
<i>Folicular</i>	14	4,0:1	45,2 ± 16,0
Carcinoma folicular	4	0:4	36,5 ± 15,0
Carcinoma oncocítico	6	0:6	52,8 ± 13,4
Carcinoma medular	3	0:3	48,7 ± 19,9
Neoplasias	71	5,5:1	43,8 ± 17,0

* - Metástases para linfonodos regionais.

A reatividade para H3S10p foi identificada como marcação nuclear, de intensidade variando de fraca a moderada, em proporção variada das células tumorais, conforme mostrado na **Figura 3**.

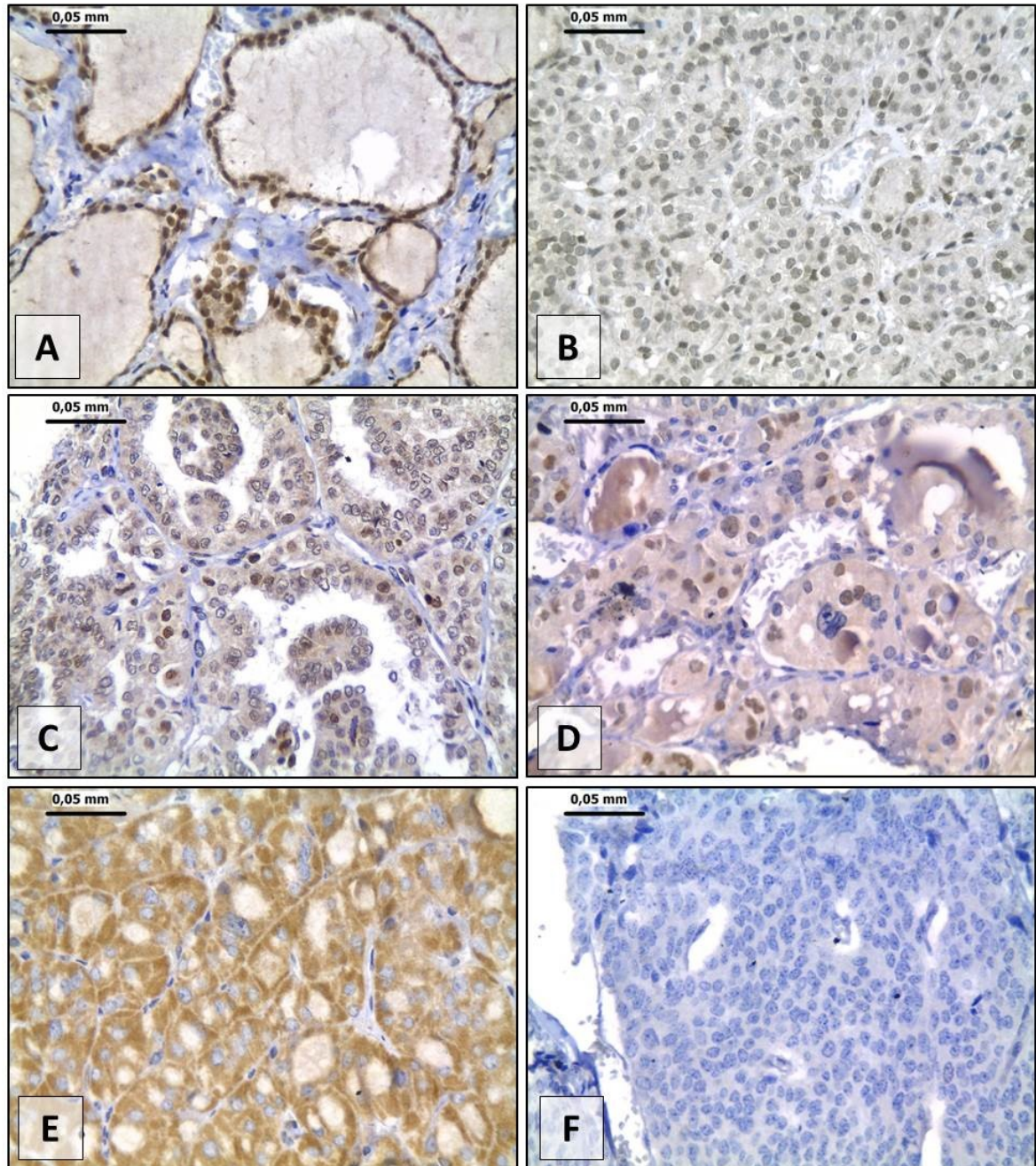


Figura 3 – Imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica para H3S10p em amostras de tireóide normal (A), adenoma folicular (B), CPT clássico (C), CPT variante folicular (D), carcinoma oncocítico (E), e carcinoma medular (F) de tireóide. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 400×.

Conforme detalhado na **Tabela 2**, a maioria das amostras de tireóide normal e de adenomas de tireóide exibiu reatividade para H3S10p, enquanto os carcinomas mostraram frequentemente uma reatividade reduzida, sendo a maioria dos casos negativos. Da mesma forma, houve um decréscimo gradativo no índice Quickscore médio das amostras de tireóide normal para as de adenomas e então para as de carcinomas. Todavia, apenas a diferença nos índices entre amostras de tecido não neoplásico e carcinomas se mostrou estatisticamente significativa, conforme ilustrado no **Gráfico 2**.

Tabela 2 – Distribuição dos casos selecionados, segundo natureza das amostras biológicas, tipo histológico dos tumores, proporção de casos reativos e índice Quickscore (QS).

Grupo	Reatividade para H3S10p	
	Proporção de casos reativos	Índice Quickscore (\bar{x})
Tireóide normal	92,9%	12,5
Adenomas	60%	5,3
Neoplasias malignas	37,7%	1,8
Carcinoma papilífero	41,7%	1,6
Carcinoma folicular	50%	7,5
Carcinoma oncocítico	0%	0
Carcinoma medular	33%	0,3

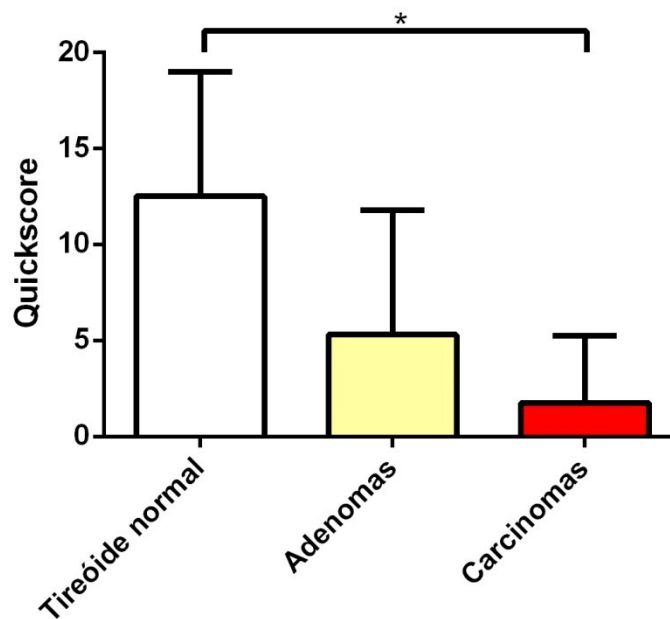


Gráfico 2 – Reatividade (média) para H3S10p em amostras de tireóide normal, adenomas e carcinomas de tireóide ($p < 0,02$, teste de Kruskal-Wallis; asterisco mostra diferença significativa entre pares, pós-teste de Dunn).

Não houve diferença significativa nos índices de Quickscore entre os diferentes tipos histológicos de carcinomas, conforme apresentado no **Gráfico 3**.

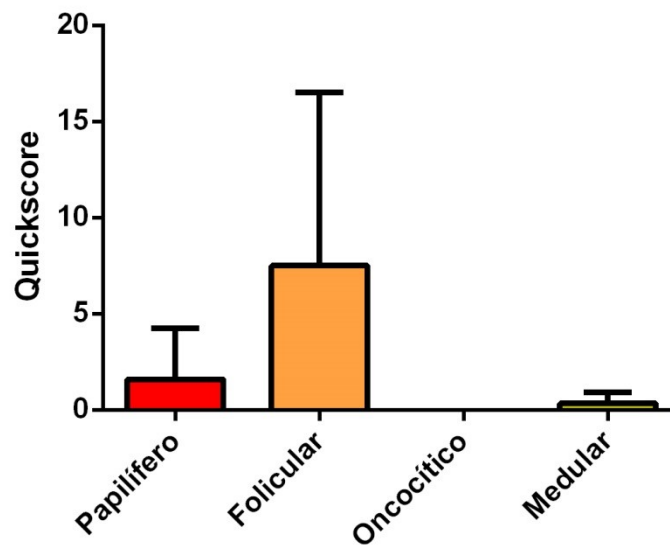


Gráfico 3 – Reatividade (média) para H3S10p em diferentes carcinomas de tireóide ($p = 0,017$, teste de Kruskal-Wallis).

Considerando apenas os carcinomas papilíferos, não houve diferença significativa no índice de Quickscore quando os casos foram segregados segundo a presença de metástases, conforme mostrado no **Gráfico 4**.

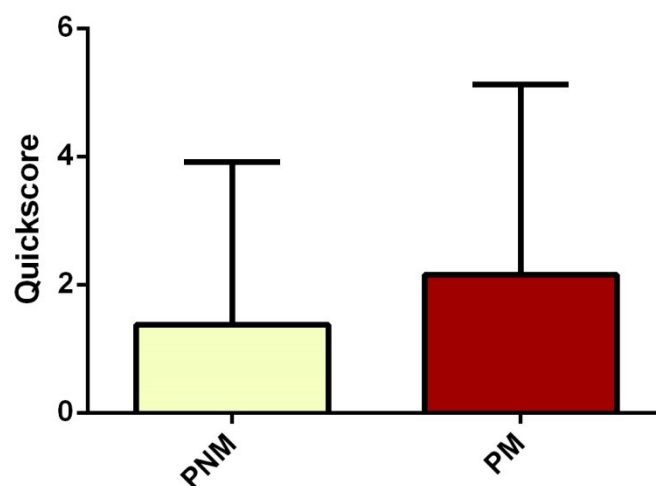


Gráfico 4 – Reatividade (média e desvio-padrão) para H3S10p em amostras de carcinomas papilíferos de tireóide, segregados em casos primários não-metastatizantes e metastatizantes para linfonodos (PNM e PM, respectivamente; $p = 0,31$, teste U de Mann-Whitney).

Finalmente, dentre os casos de CPT, verificou-se predomínio de mulheres, de pacientes com até 45 anos de idade, de tumores unifocais, não capsulados, sem evidência de necrose, invasão vascular ou extratireoidiana, conforme mostrado na **Tabela 3**. Nessa mesma Tabela, verificou-se que a média do índice Quickscore para reatividade de H3S10p foi significativamente menor no grupo de pacientes com mais de 45 anos. Nenhuma outra comparação dos casos segundo os demais parâmetros clínicos ou patológicos dos carcinomas papilíferos foi estatisticamente significativa.

Tabela 3 – Distribuição dos carcinomas papilíferos de tireóide segundo parâmetros clínicos e patológicos, bem como comparação da reatividade imuno-histoquímica para H3S10p entre grupos diferentes, segundo o índice de Quickscore (QS).

Parâmetro	Característica	<i>n</i>	<i>n</i> total	QS médio	Teste	<i>p</i>																																																																																						
Sexo	Feminino	40	48	2,8	Mann-Whitney	0,14																																																																																						
	Masculino	8		3,1			Idade	Até 45 anos	25	48	0,8	Mann-Whitney	0,03	> 45 anos	23	1,7	Tamanho	Até 4cm	36	42	2,5	Mann-Whitney	0,20	> 4cm	6	1,3	Focalidade	Unifocais	27	45	1,3	Mann-Whitney	0,08	Multifocais	18	2,3	Cápsula fibrosa	Ausente	26	46	1,4	Mann-Whitney	0,93	Presente	20	1,9	Necrose	Ausente	43	46	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	3	1,7	Mitoses	Ausentes	22	46	1,9	Mann-Whitney	0,68	> 1 em 10cga	24	1,4	Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87	Presente	16	1,6	Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney
Idade	Até 45 anos	25	48	0,8	Mann-Whitney	0,03																																																																																						
	> 45 anos	23		1,7			Tamanho	Até 4cm	36	42	2,5	Mann-Whitney	0,20	> 4cm	6	1,3	Focalidade	Unifocais	27	45	1,3	Mann-Whitney	0,08	Multifocais	18	2,3	Cápsula fibrosa	Ausente	26	46	1,4	Mann-Whitney	0,93	Presente	20	1,9	Necrose	Ausente	43	46	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	3	1,7	Mitoses	Ausentes	22	46	1,9	Mann-Whitney	0,68	> 1 em 10cga	24	1,4	Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87	Presente	16	1,6	Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7						
Tamanho	Até 4cm	36	42	2,5	Mann-Whitney	0,20																																																																																						
	> 4cm	6		1,3			Focalidade	Unifocais	27	45	1,3	Mann-Whitney	0,08	Multifocais	18	2,3	Cápsula fibrosa	Ausente	26	46	1,4	Mann-Whitney	0,93	Presente	20	1,9	Necrose	Ausente	43	46	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	3	1,7	Mitoses	Ausentes	22	46	1,9	Mann-Whitney	0,68	> 1 em 10cga	24	1,4	Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87	Presente	16	1,6	Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7																
Focalidade	Unifocais	27	45	1,3	Mann-Whitney	0,08																																																																																						
	Multifocais	18		2,3			Cápsula fibrosa	Ausente	26	46	1,4	Mann-Whitney	0,93	Presente	20	1,9	Necrose	Ausente	43	46	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	3	1,7	Mitoses	Ausentes	22	46	1,9	Mann-Whitney	0,68	> 1 em 10cga	24	1,4	Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87	Presente	16	1,6	Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7																										
Cápsula fibrosa	Ausente	26	46	1,4	Mann-Whitney	0,93																																																																																						
	Presente	20		1,9			Necrose	Ausente	43	46	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	3	1,7	Mitoses	Ausentes	22	46	1,9	Mann-Whitney	0,68	> 1 em 10cga	24	1,4	Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87	Presente	16	1,6	Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7																																				
Necrose	Ausente	43	46	1,7	Mann-Whitney	0,92																																																																																						
	Presente	3		1,7			Mitoses	Ausentes	22	46	1,9	Mann-Whitney	0,68	> 1 em 10cga	24	1,4	Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87	Presente	16	1,6	Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7																																														
Mitoses	Ausentes	22	46	1,9	Mann-Whitney	0,68																																																																																						
	> 1 em 10cga	24		1,4			Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87	Presente	16	1,6	Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7																																																								
Invasão vascular	Ausente	30	46	1,7	Mann-Whitney	0,87																																																																																						
	Presente	16		1,6			Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92	Presente	15	1,7	Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7																																																																		
Invasão extratireoidiana	Ausente	30	45	1,7	Mann-Whitney	0,92																																																																																						
	Presente	15		1,7			Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18	Comprometidas	9	0,7																																																																												
Margens cirúrgicas	Livres	37	46	1,9	Mann-Whitney	0,18																																																																																						
	Comprometidas	9		0,7																																																																																								

6. DISCUSSÃO

Relativamente poucos trabalhos avaliaram modificações pós-traducionais de histonas em tumores de tireóide. Puppini et al. (2011) mostraram que os níveis de acetilação da lisina 18 da histona H3 (H3K18ac) são mais baixos nos cânceres indiferenciados em relação aos diferenciados. Os mesmos autores relataram ainda níveis aumentados de acetilação da lisina 12 da histona 4 (H4K12ac) no adenoma folicular, mas não no carcinoma folicular da tireóide. Em estudo anterior (MORAES, 2014), nosso grupo de pesquisa observou resultado diverso ao de Puppini, posto que todas as amostras de tireóide normal, adenomas e carcinomas papilíferos se mostraram completamente reativas para H4K12ac. Kondo et al. (2009), relataram aumento nos níveis de dimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me2) e diminuição da acetilação do mesmo resíduo da histona H3 (H3K9Ac) num subgrupo de células de carcinoma da tireóide que apresentava perda da expressão do gene TTF-1 (do inglês, thyroid transcription factor 1).

A verificação no presente estudo de redução gradativa da reatividade para H3S10p da tireóide normal para adenomas, e desses para os carcinomas, sugere que fatores responsáveis pela carcinogênese (formação inicial da neoplasia) e pela progressão tumoral (aquisição de fenótipo gradativamente mais agressivo) estejam também associados a redução na fosforilação de histonas, e que essa característica possa ser eventualmente utilizada para a identificação de neoplasias e para a distinção entre tumores benignos e malignos de tireóide, com aplicação por exemplo na análise de aspirados citológicos. O resultado observado é semelhante ao que tem sido relatado para tumores de cérebro, mama, próstata, bexiga, nasofaringe, fígado, cólon e reto (OTA et al., 2002; SISTAYANARAIN et al., 2006; LUO et al., 2011; CHA et al., 2015; LI et al., 2013; FAGAN-SOLIS et al., 2014; NOWAK et al., 2014; PACAUD et al., 2015). Todavia, o uso dessa associação como ferramenta auxiliar ao diagnóstico não pode ser tomada como absoluta, frente à existência de casos não reativos dentre as amostras de tireóide normal e de adenomas. A reatividade reduzida em carcinomas em comparação a adenomas e tecido normal é ainda contraditória com a postulada aplicação de H3S10p como marcadora de proliferação celular (VERAS et al., 2009; FUKUSHIMA et al., 2009; YANG, 2011; TSUTA, et al., 2011; LADSTEIN et al., 2012). Sabe-se que a fosforilação de H3S10 ocorre não somente na mitose, mas pode ocorrer (restrita a poucos genes) em também em células interfásicas e em células apoptóticas (CHOI et al., 2005; PRINGENT e DIMITROV, 2003; LABRADOR e CORCES, 2002; NOWAK e CORCES, 2000; HENDZEL et al., 1998).

Sobre as características gerais da casuística avaliada, verificou-se que a grande maioria dos pacientes com neoplasias tireoidianas, benignas e malignas, era do sexo feminino, com uma proporção entre os sexos feminino e masculino variando entre 4:1 e 6:1. Uma proporção relativamente maior do que o esperado, que é de 2:1 a 4:1. A faixa etária variou de $32,9 \pm 16,4$ a $46,2 \pm 15,1$ anos. Tal perfil epidemiológico corresponde ao usualmente relatado na literatura (ROSAI, CARANGIU E DELELLIS, 1992; LIVOLSI et al., 2004; NIKIFOROV e OHORI, 2012).

Observou-se que pacientes mais velhos, cujo prognóstico é usualmente pior (SIMPSON ET AL., 1987), apresentaram lesões em que a reatividade média foi reduzida em comparação aos tumores de pacientes mais jovens. Um estudo experimental mostrou que a reatividade para H3S10p é maior em ratos mais velhos (KAWAKAMI et al., 2009). Em tumores, estudo recente (GOOSSENS-BEUMER et al., 2014) não identificou variação com a idade da reatividade imuno-histoquímica para H3K9ac ou H3K27me3 em carcinoma colorretal, todavia mostrou que reatividade elevada para esses marcadores está associada a pior prognóstico em pacientes com mais de 65 anos. Não se identificou nenhuma outra associação significativa entre a reatividade para H3S10p e os demais parâmetros avaliados, de onde se deduz que não há grande interferência dessa modificação de histona com o comportamento tumoral.

O estudo da forma fosforilada de H3S10p foi motivada pelas evidências de sua marcante participação na condensação e segregação dos cromossomos na mitose (SUN et al., 2012; JOHANSEN e JOHANSEN, 2006; PRINGENT e DIMITROV, 2003), bem como pelos vários relatos sobre altos níveis de H3S10p em diversos tipos de cânceres humanos (OTA et al., 2002; SISTAYANARAIN et al., 2006; LUO et al., 2011; CHA et al., 2015; LI et al., 2013; FAGAN-SOLIS et al., 2014; NOWAK et al., 2014; PACAUD et al., 2015) e pelo envolvimento de H3S10p na ativação de alguns proto-oncogenes (CHOI et al., 2005; NOWAK e CORCES, 2000).

Além disso, todo o estudo se pautou sobre análises imuno-histoquímicas criteriosas, porém obviamente existem limitações relacionadas à técnica escolhida, tais como a dificuldade de se quantificar os resultados, a dificuldade de padronização dos anticorpos e a alta dependência de técnicos de laboratório e patologistas bem treinados para a execução dos procedimentos laboratoriais e para a interpretação dos resultados consequentes. Não obstante, a escolha da imuno-histoquímica se baseou na sua praticidade e no seu amplo uso por parte dos patologistas. É uma técnica laboratorial bem estabelecida, frequentemente utilizada na rotina

dos principais laboratórios de patologia, onde ajuda a identificar agentes infecciosos, células neoplásicas e sítios primários de metástases, bem como a estabelecer o grau de malignidade de tumores. Tem a imensa vantagem de ser utilizada em materiais fixados, que proporcionam uma boa visualização da alteração histológica em conjunto com o antígeno pesquisado. Além disso, é de rápida execução e relativamente barata. Uma vez que fossem encontradas modificações com significado diagnóstico e prognóstico através da imuno-histoquímica, estaríamos diante de uma ferramenta poderosa e com potencial de ampla utilização.

O uso do *Quickscore* (QS) (DETRE, JOTTI e DOWSETT, 1995) para a quantificação das marcações imuno-histoquímicas minimizou o “fator subjetividade”, tornando a avaliação padronizada e objetiva. Conforme descrito anteriormente na metodologia, o QS permite uma avaliação da proporção de células positivas e da intensidade da coloração para a classificação dos casos em categorias pré-estabelecidas.

Finalmente, existem outros métodos que podem ser utilizados para a avaliação das modificações de histonas, como por exemplo Western Blotting, Immunoblotting, métodos de purificação de histonas, imunoprecipitação de cromatina (ChIP), imunoprecipitação de cromatina com microarranjo de DNA (ChIP-chip) e imunoprecipitação de cromatina com sequenciamento de DNA (ChIP-seq). No entanto, vários deles não estão disponíveis em alguns laboratórios, são caros e de difícil aplicabilidade na rotina laboratorial. Dessa forma, objetivou-se encontrar um marcador específico para o diagnóstico ou prognóstico de neoplasias tireoidianas através de uma técnica de fácil acesso para a maioria dos médicos patologistas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que há uma redução gradativa da reatividade para H3S10p da tireóide normal para adenomas, e desses para os carcinomas, de forma que casos com reatividade baixa ou ausente mais provavelmente são neoplasias malignas.

Observou-se que pacientes mais velhos, cujo prognóstico é usualmente pior, apresentaram lesões em que a reatividade média foi reduzida em comparação aos tumores de pacientes mais jovens. Para os demais parâmetros avaliados, não se identificou nenhuma associação significativa com a reatividade para H3S10p, de onde se deduz que não há grande interferência dessa modificação de histona com o comportamento tumoral.

Por fim, os resultados sugerem uma possível participação da H3S10p no desenvolvimento de neoplasias tireoidianas, que precisam ser melhor esclarecidas em estudos adicionais.

REFERÊNCIAS

AKSLEN, L.A.; LIVOLSI, V.A. Prognostic significance of histologic grading compared with subclassification of papillary thyroid carcinoma. **Cancer**, v.88, n.8, p.1902-1908, 2000.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000415\)88:8<1902::AID-CNCR20>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000415)88:8<1902::AID-CNCR20>3.0.CO;2-Y)

ALBERTS, B., et al. **Molecular Biology of the Cell**, 5.ed. New York: Garland Science, 2008, 1.268 p.

AL BRAHIM, N.; ASA, S.L. Papillary thyroid carcinoma: an overview. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.130, n.7, p.1057-1062, 2006.

ALEXEYEV, M. et al. The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v.5, p.1-17, 2003.

ALVA, V. et al. On the origin of the histone fold. **BMC structural biology**, v.7, p.1-10, 2007.
<https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-17>

BALOCH, Z.W.; LIVOLSI, V.A. Encapsulated follicular variant of papillary carcinoma with bone metastasis. **Modern Pathology**, v.13, p.861-865, 2000.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3880153>

BARTH, T.K.; IMHOF, A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. **Trends in Biochemical Sciences**, v.35, n.11, p.618-626, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.006>

BAYLIN, S.B.; JONES P.A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer**, v.11, p.726-734, 2011.
<https://doi.org/10.1038/nrc3130>

BERGER, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v.447, p.407-412, 2007.
<https://doi.org/10.1038/nature05915>

BIDDINGER, P.W. Normal anatomy and histology. In: NIKIFOROV, Y.E.; BIDDINGER, P.W.; THOMPSON, L.D.R. eds. **Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. cap.1, p.1-10.

BOERNER, S.L.; ASA, S.L. Papillary lesions. In: _____. **Biopsy interpretation of the thyroid**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. cap.9, p.96-151.

BROWN, R.L.; SOUZA, J.A.; COHEN, E.E.W. Thyroid cancer: burden of illness and management of disease. **Journal of cancer**, v.2, p.193-199, 2011.
<https://doi.org/10.7150/jca.2.193>

BUSTIN, M.; CATEZ, F.; LIM, J. The dynamics of histone H1 function in chromatin. **Molecular Cell**, v.17, n.5, p.617-620, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.019>

CANNON, J. The Significance of Hürthle Cells in Thyroid Disease. **The Oncologist**, v.16, p.1380–1387, 2011.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0253>

CARANGIU, M.L. Thyroid. In: MILLS, S.E. ed. **Histology for Pathologists**. 3.ed. S.1: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap.44, p.1129-1148.

CASCONI, A. et al. Destabilization of the Outer and Inner Mitochondrial Membranes by Core and Linker Histones. **PLoS one**, v.7, n.4, 2012

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035357>

CATALANO, M.G.; FORTUNATI, N.; BOCCUZZI, G. Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v.3, p.1-8, 2012.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00040>

CHA, T.L. et al. Emodin modulates epigenetic modifications and suppresses bladder carcinoma cell growth. **Molecular Carcinogenesis**, v.54, n.3, p.167-177, 2015.

<https://doi.org/10.1002/mc.22084>

CHADEE, D.N. et al. Increased ser-10 phosphorylation of histone h3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.35, p.24914-24920, 1999.

<https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24914>

CHEN, A.Y.; JEMAL, A.; WARD, E.M. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. **Cancer**, v.115, p.3801-3807, 2009.

<https://doi.org/10.1002/ncr.24416>

CHEN, M. et al. H3K9 Histone Methyltransferase G9a Promotes Lung Cancer Invasion and Metastasis by Silencing the Cell Adhesion Molecule Ep-CAM. **Cancer Research**, v.70, p.7830-7840, 2010.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0833>

CHERVONA, Y.; COSTA, M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? **American Journal of Cancer Research**, v.2, n.5, p.589-597, 2012.

CHI, P.; ALLIS, C.D.; WANG, G.G. Covalent histone modifications: miswritten, misinterpreted and miserased in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v.10, p.457–459, 2010.

<https://doi.org/10.1038/nrc2876>

CHOI, H.S. Phosphorylation of histone h3 at serine 10 is indispensable for neoplastic cell transformation. **Cancer Research**, v.13, p.5818-5827, 2005.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0197>

CHRISOULIDOU, A. et al. Histological subtype is the most important determinant of survival in metastatic papillary thyroid cancer. **Thyroid Research**, v.4, n.1, p.1-5, 2011.

<https://doi.org/10.1186/1756-6614-4-12>

COHEN, I. et al. Histone Modifiers in Cancer: Friends or Foes? **Genes & Cancer**, v.2, n.6, p.631–647, 2011.

<https://doi.org/10.1177/1947601911417176>

COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Carcinomas of the Thyroid Gland, 2009. Disponível em: http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2009/Thyroid_09protocol.pdf. Acesso em 05 jan. 2015.

DAWSON, M.A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, v.150, n.1, p.12-27, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>

DEAN, D.S.; HAY, I.D. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. **Cancer Control**, v.7, n.3, p.229-239, 2000.

<https://doi.org/10.1177/107327480000700302>

DELELLIS, R.A.; WILLIAMS E.D. Thyroid and parathyroid tumors: Introduction. In: DELELLIS et al. eds. **WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs**. Lyon: IARC Press, 2004. cap.2, p.49-56.

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

<https://doi.org/10.1002/jso.20700>

DAVIES, L.; WELCH, H.G. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. **The Journal of the American Medical Association**, v.295, n.18, p.2164-2167, 2006.

<https://doi.org/10.1001/jama.295.18.2164>

DETRE, S.; JOTTI, G.S.; DOWSETT, M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v.48, p.876-878, 1995.

<https://doi.org/10.1136/jcp.48.9.876>

ELSHEIKH T.M. et al. Interobserver and intraobserver variation among experts in the diagnosis of thyroid follicular lesions with borderline nuclear features of papillary carcinoma. **The American Journal of Clinical Pathology**, v.130, p.736-744, 2008.

<https://doi.org/10.1309/AJCPKP2QUVN4RCCP>

ESPINO, P.S. Genomic instability and histone H3 phosphorylation induction by the Ras-mitogen activated protein kinase pathway in pancreatic cancer cells. **International journal of cancer**, v.124, n.3, p.562-567, 2009.

<https://doi.org/10.1002/ijc.23959>

FAGAN-SOLIS K.D. et al. SKP2 overexpression is associated with increased serine 10 phosphorylation of p27 (pser10p27) in triple-negative breast cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v.229, n.9, p.1160-1169, 2014.

<https://doi.org/10.1002/jcp.24545>

FALKENBERG, K.J.; JOHNSTONE, R.W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.13, p.673–691, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nrd4360>

FEINBERG, A.P.; TICKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.143-153, 2004.

<https://doi.org/10.1038/nrc1279>

FISCHER, S.; ASA, S.L. Application of immunohistochemistry to thyroid neoplasms. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.132, p. 359-372, 2008.

FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C. D. Histone and chromatin cross-talk. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.2, p.172-183, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00013-9)

FUKUSHIMA, S. et al. Sensitivity and usefulness of anti-phosphohistone-H3 antibody immunostaining for counting mitotic figures in meningioma cases. **Brain Tumor Pathology**, v.26, n.2, p.51-57, 2009.

<https://doi.org/10.1007/s10014-009-0249-9>

GIMM, O.; DRALLE, H. Differentiated thyroid carcinoma. In: HOLZHEIMER R.G., MANNICK J.A. eds. **Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented**. Munich: Zuckschwerdt, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6979/?report=reader> . Acesso em: 15 nov.2014.

GIRARDI, F.M.; BARRA, M.B.; ZETTLER, C.G. Variants of papillary thyroid carcinoma: association with histopathological prognostic factors. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.79, n.6, p.738-744, 2013.

<https://doi.org/10.5935/1808-8694.20130135>

GOLDBERG, A.D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v.128, n.4, p.635-638.

GOOSSENS-BEUMER, I.J. Age-dependent clinical prognostic value of histone modifications in colorectal cancer. **Translational Research**, p.1-11, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>

GOUVEIA, C. et al. Lack of association of BRAF mutation with negative prognostic indicators in papillary thyroid carcinoma: the University of California, San Francisco, experience. **JAMA Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v.139, n.11, p.1164-1170, 2013.

<https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.4501>

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

<https://doi.org/10.3390/cancers2020885>

GUAN, H. et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.94, n.5, p.1612-1617, 2009.

<https://doi.org/10.1210/jc.2008-2390>

GURARD-LEVIN, Z.A.; ALMOUZNI, G.; Histone modifications and a choice of variant: a language that helps the genome express itself. **F1000prime reports**, v.6, p.1-10, 2014.
<https://doi.org/10.12703/P6-76>

HE, H.; LEHMING, N. Global effects of histone modifications. **Briefings in functional genomics and proteomics**, v.2, n.3, p.234–243, 2003.
<https://doi.org/10.1093/bfgp/2.3.234>

HENDZEL, M.J. et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v.106, p.348-360, 1997.
<https://doi.org/10.1007/s004120050256>

HERCEG, Z.; MURR, R. Mechanisms of Histone Modification. In: Tollefsbol, T.O. ed. **Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics**. S.l.: Elsevier, 2011. cap.3, p.25-45.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375709-8.00003-4>

HIROKAWA, M. et al. Observer variation of encapsulated follicular lesions of the thyroid gland. **The American Journal of Clinical Pathology**, v.26, n.11, p.1508-1514, 2002.

HORN-ROSS, P.L. et al. Iodine and thyroid cancer risk among women in a multiethnic population: The bay area thyroid cancer study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.10, p.979-985, 2001.

IBUKI, Y. et al. Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. **Carcinogenesis**, v.35, n.6, p.1228-1238, 2014.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgt492>

ILEANA, S.S.; DAVIE, J.R. Ser-10 phosphorylation of histone h3 and immediate early gene expression in mouse fibroblast. **Cancer Research**, v.62, p.75-78, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2014. **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> . Acesso em: 20 novembro 2014.

IZZO, A.; SCHNEIDER, R. Chatting histone modifications in Mammals. **Briefings in Funcional Genomics**, v.9, n.6, p.429- 443, 2010.
<https://doi.org/10.1093/bfgp/elq024>

JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. **Science**, v.293, p.1074-1081, 2001.
<https://doi.org/10.1126/science.1063127>

JOHANSEN, K.M.; JOHANSEN, J. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. **Chromosome research**, v.14, n.4, p.393-404, 2006.
<https://doi.org/10.1007/s10577-006-1063-4>

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. Glândulas endócrinas. In: _____. **Histologia Básica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap.20, p.406-411.

- KAMAKAKA, R.T.; BIGGINS, S. Histone variants: deviants? **Genes & Development**, v.19, p.295-316, 2005.
<https://doi.org/10.1101/gad.1272805>
- KAZAK, L.; REYES, A.; HOLT, I.J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v.13, p.659-671, 2012.
<https://doi.org/10.1038/nrm3439>
- KAWAKAMI, K. et al. Age-related difference of site-specific histone modifications in rat liver. **Biogerontology**, v.10, p.415-421, 2009.
<https://doi.org/10.1007/s10522-008-9176-0>
- KE, Q. et al. Nickel compounds induce phosphorylation of histone H3 at serine 10 by activating JNK–MAPK pathway. **Carcinogenesis**, v.26, n.6, p.1276-1281, 2008.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgn084>
- KHORASANIZADEH, S. The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. **Cell**, v.116, p.259-272, 2004.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00044-3)
- KIM, H. et al. Mitogen- and stress-activated kinase 1 histone h3 phosphorylation is crucial for cell transformation. **Cancer Research**, v.68, n.7, 2538-2547, 2008.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6597>
- KIM, T.Y. et al. Current status and future perspectives in differentiated thyroid cancer. **Endocrinology and Metabolism**, v.29, p.217-225, 2014.
<https://doi.org/10.3803/EnM.2014.29.3.217>
- KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.51, n.5, p.701-712, 2007.
<https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000500007>
- 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, n.7, p.791–799, 2009.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.50>
- KONDO, T.; EZZAT, S.; ASA, S.L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular cell neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v.6, n.4, p.292-306, 2006.
<https://doi.org/10.1038/nrc1836>
- KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v.128, n.4, p.693–705, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- KUTANZI, K.; KOVALCHUK, O. Exposure to estrogen and ionizing radiation causes epigenetic dysregulation, activation of mitogen-activated protein kinase pathways, and genome instability in the mammary gland of ACI rats. **Cancer Biology & Therapy**, v.14, n.7, p.564-573, 2013.
<https://doi.org/10.4161/cbt.24599>

LABRADOR, M.; CORCES, GC. Phosphorylation of histone H3 during transcriptional activation depends on promoter structure. **Genes & development**, v.17, p.43-48, 2003.
<https://doi.org/10.1101/gad.1021403>

LADSTEIN, R.G. et al. Prognostic importance of the mitotic marker phosphohistone h3 in cutaneous nodular melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v.132, p.1247-1252, 2012.
<https://doi.org/10.1038/jid.2011.464>

LEE, C. et al. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. **BMC Cancer**, v.11, n.1, p.1-9, 2011.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-58>

LEE, H.T. et al. Effects of the activated mitogen-activated protein kinase pathway via the c-ros receptor tyrosine kinase on the T47D breast cancer cell line following alcohol exposure. **Oncology reports**, v.29, n.3, p.868-874, 2013.
<https://doi.org/10.3892/or.2012.2209>

LEWINSKI, A. et al. Thyroid carcinoma: diagnostic and therapeutic approach; Genetic background (Review). **Endocrine Regulations**, v.34, p.99-113, 2000.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. The Role of Chromatin during Transcription. **Cell**, v.128, p.707-719, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>

LI, B. et al. Increased phosphorylation of histone H3 at serine 10 is involved in Epstein-Barr virus latent membrane protein-1-induced carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. **BMC Cancer**, v.13, p.1-11, 2013.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-124>

LINDSAY, S.; DAILEY, M.E.; JONES, M.D. Histologic effects of various types of ionizing radiation on normal and hyperplastic human thyroid glands. **The Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v.14, n.10, 1954.
<https://doi.org/10.1210/jcem-14-10-1179>

LIVOLSI, V.A. et al. Papillary carcinoma. In: DELELLIS et al. eds. **WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs**. Lyon: IARC Press, 2004. cap.2, p.57-66.

LIVOLSI, V.A. Papillary thyroid carcinoma: an update. **Modern Pathology**, v.24 (suppl.2), n.S2. p. S1-S9, 2011.

LUGER, K. Nucleosomes: structure and function. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001.
 Disponível em: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001155.html>. Acesso em: 01/11/2014.

LUNDGREN, C.I. et al. Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: a population-based, nested case-control study. **Cancer**, v.106, p.524-531, 2006.
<https://doi.org/10.1002/cncr.21653>

LUO, X. et al. Histone Modification and Breast Cancer. Breast Cancer. In: GUNDUZ, M. ed. **Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis**. Shanghai:

InTech, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-focusing-tumor-microenvironment-stem-cells-and-metastasis/histone-modification-and-breast-cancer>>. Acesso em: 25 out. 2014.

MAESHIMA, K.; HIHARA, S.; ELTSOV, M. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? **Current Opinion in Cell Biology**, v.22, n.3, p.291-297, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.03.001>

MATIAS-GUIU, et al. Medullary thyroid carcinoma. In: DELELLIS et al. eds. **WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs**. Lyon: IARC Press, 2004. cap.2, p.86-91.

MAZOKOPAKIS, E.E et al. Coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma. A retrospective study. **Hormones**, v.9, n.4, p.312-317, 2010.

MORAES, S. Estudo das histonas H4K12ac e H3K36me3 em neoplasias da tireóide: comparação entre tipos histológicos e comportamento metastático. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, 2014. 74p.

NASR R.M. et al. Immunohistochemical markers in diagnosis of papillary thyroid carcinoma: utility of HBME1 combined with CK19 immunostaining. **Modern Pathology**, v.19, p.1631-1637, 2006.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800705>

NIKIFOROV, Y.E.; OHORI, P. Papillary carcinoma. In: NIKIFOROV, Y.E.; BIDDINGER, P.W.; THOMPSON, L.D.R. eds. **Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. cap.11, p.183-246.

NIKIFOROV, Y.E. Thyroid tumors: classification, staging and general considerations. In: NIKIFOROV, Y.E.; BIDDINGER, P.W.; THOMPSON, L.D.R. eds. **Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. cap.7, p.77-80.

NOCITO, A; et al. Tissue microarrays (tmas) for high-throughput molecular pathology research. International. **Journal of Cancer**, v.94, p.1-5, 2001.
<https://doi.org/10.1002/ijc.1385>

NOSÉ, V. Familial thyroid cancer: a review. **Modern Pathology**, v.24, sup.2, p.S19-S33, 2011.

NOWAK, M. et al. Prognostic significance of phospho-histone H3 in prostate carcinoma. **World Journal of Urology**, v.32, n.3, p.703-707, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s00345-013-1135-y>

NOWAK, S.J.; CORCES, G.C. Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. **Genes & development**, v.14, p.3003-3013, 2000.
<https://doi.org/10.1101/gad.848800>

ORDONEZ, N. et al. Undifferentiated (anaplastic) carcinoma. In: DELELLIS et al. eds. **WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs**. Lyon: IARC Press, 2004. cap.2, p.49-56.

- OTA, T. et al. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. **Cancer Research**, v.62, p.5168-5177, 2002.
- PACAUD, R. et al. Histone H3 Phosphorylation in GBM: a New Rational to Guide the Use of Kinase Inhibitors in anti-GBM Therapy. **Theranostics**, v.5, n.1, p.12-22, 2015.
<https://doi.org/10.7150/thno.8799>
- PACINI, F. et al. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v.23, supp.7, p.vii110-vii119, 2012.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mds230>
- PELLEGRITI, G. et al. Papillary thyroid cancer incidence in volcanic area of Sicily. **Journal of the National Cancer Institute**, v.101, n.22, p.1575-1583, 2009.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djp354>
- PEPENELLA, S.; MURPHY, K.J.; HAYES, J.J. Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. **Chromosoma**, v.123, p.3-13, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s00412-013-0435-8>
- PRIGENT, C.; DIMITROV, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? **Journal of Cell Science**, v.116, p.3677-3685, 2003.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00735>
- 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.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-0128>
- PUPPIN, C.; et al. Levels of histone acetylation in thyroid tumors. **Biochemical and biophysical research communications**, v.411, n.4, p.679-683, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.182>
- QU, N. et al. Number of tumor foci predicts prognosis in papillary thyroid cancer. **Biomed Central Cancer**, v.14, n.1, p.1-6, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-914>
- RAMAKRISHNAN, V. Histone structure and the organization of the nucleosome. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v.26, p.83-112, 1997.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.26.1.83>
- ROTHBART, S.B.; STRAHL, B.D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochimica et biophysica acta**, n.8, p.627-643, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>
- ROSAI, J.; CARANGIU, M.L.; DELELLIS, R.A. The normal thyroid gland. In: _____. **Tumors of the thyroid gland**. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, n.5, 1992. p.1-17.

ROSAI, J.; CARANGIU, M.L.; DELELLIS, R.A. Papillary carcinoma. In: _____. **Tumors of the thyroid gland**. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, n.5, 1992. p.65-121.

RUSSO, D. et al. Epigenetics of thyroid cancer and novel therapeutic targets. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.46, n.3, p.R73–R81, 2011.
<https://doi.org/10.1530/JME-10-0150>

SAKORAFAS, G.H.; SAMPANIS, D.; SAFIOLEAS, M. Cervical lymph node dissection in papillary thyroid cancer: Current trends, persisting controversies, and unclarified uncertainties. **Surgical Oncology**, v.19, n.2, p.e57-e70, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.suronc.2009.04.002>

SANTOS-ROSA, H. and CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer**, v.41, p.2381–2402, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.010>

SAWICKA, A.; SEISER, C. Sensing core histone phosphorylation - a matter of perfect timing. **Biochimica et biophysica acta**, n.8, p.711-718, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.04.013>

SCHNEIDER, D.F.; CHEN, H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. **A Cancer Journal for Clinicians**, v.63, n.6, p.373-394, 2013.

SIEGEL, R. et al. Cancer Statistics, 2014. **A Cancer Journal for Clinicians**, v.64, p.9-29, 2014.

SILVER, C.E. et al. Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. **Head & Neck**, p.1052-1059, 2011.
<https://doi.org/10.1002/hed.21494>

SIMÕES, M.S. et al. Follicular carcinoma. In: DELELLIS et al. eds. **WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs**. Lyon: IARC Press, 2004. cap.2, p.67-72.

SIMPSON, W.J. et al. Papillary and follicular thyroid cancer: prognostic factors in 1578 patients. **The American Journal of medicine**, v.83, p.479-488, 1987.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90758-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90758-3)

SINNA, E.A.; EZZAT, N. Diagnostic accuracy of fine needle aspiration cytology in thyroid lesions. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v.24, n.2, p.63-70, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jnci.2012.01.001>

SISTAYANARAIN, A. et al. Expression of Aurora-B kinase and phosphorylated histone H3 in hepatocellular carcinoma. **Anticancer Research**, v.26, p.3585-3594, 2006.

STRAHL, B.D.; ALLIS, C.D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v.403, p.41–45, 2000.
<https://doi.org/10.1038/47412>

- STRELKOV, I.S.; DAVIE, J.R. Ser-10 Phosphorylation of Histone H3 and Immediate Early Gene Expression in mouse fibroblast. **Cancer Research**, v.62, p.75-78, 2002.
- SUN, A. et al. Level of phosphohistone H3 among various types of human cancers. **BMJ Open**, v.2, n.5, p.1-7, 2012.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001071>
- TABY, R.; ISSA, J.J. Cancer epigenetics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v.60, p.376-392, 2010.
- TALLINI, G.; ROSAI, J. Thyroid gland. In: ROSAI, J., org. **Rosai and Ackerman's surgical pathology**. 10.ed. S.l.: Elsevier, 2011. cap. 9, p.500-563.
- TARK-DAME, M.; VAN DRIEL, R.; HEERMANN, D.W. Chromatin folding: from biology to polymer models and back. **Journal of cell Science**, v.124, p.839-845, 2011.
<https://doi.org/10.1242/jcs.077628>
- THOMPSON, L.L. et al. Regulation of chromatin structure via histone post-translational modification and the link to carcinogenesis. **Cancer Metastasis Reviews**, v.32, n.3-4, p.363-376, 2013.
<https://doi.org/10.1007/s10555-013-9434-8>
- TSUTA, K. et al. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. **American Journal of Clinical Pathology**, v.136, p.252-259, 2011.
<https://doi.org/10.1309/AJCPDXFOPXGEF0RP>
- VERAS, E. et al. Mitosis-specific marker phospho-histone H3 in the assessment of mitotic index in uterine smooth muscle tumors: a pilot study. **International Journal of Gynecologic Pathology**, v.28, n.4, p.316-321, 2009.
<https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e318193df97>
- VIDALI, G.; GERSHEY, E.L.; ALLFREY, V.G. Vincent Allfrey's Work on Histone Acetylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, n.3, p.2270-2271, 2012.
<https://doi.org/10.1074/jbc.O112.000248>
- WIERSINGA, W.M. Differentiated pediatric carcinoma in pediatric age. **Pediatric and Adolescent Medicine**, v.11, p.210-224, 2007.
- WUNDERLICH, A. et al. Evaluation of aurora kinase inhibition as a new therapeutic strategy in anaplastic and poorly differentiated follicular thyroid cancer. **Cancer Science**, v.102, n.4, p.762-768, 2011.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01853.x>
- XING, M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.321, n.1, p.86-93, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.10.012>
- XU, Y.; PRICE, B.D. Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. **Cell Cycle**, v.10, n.2, p.261-267; 2011.
<https://doi.org/10.4161/cc.10.2.14543>

YIP, L. Use of molecular markers for cytologically indeterminate thyroid nodules to optimize surgical management. **Current Surgery Reports**, v.2, n.1, p.1-7, 2013.

ZHONG, Q. et al. Role of Phosphorylated Histone H3 Serine 10 in DEN-induced Deregulation of Pol III Genes and Cell Proliferation and Transformation. **Carcinogenesis**, p.1-29, 2013.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgt219>

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética

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 análises imunistoquímicas 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, antípodos 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 imunistoquímicos 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

∫ 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).

∫ 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.

∫ 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 ∫ ANVISA ∫ junto com seu posicionamento.

∫ 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

