



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Mario Lucio Cordeiro Araujo Junior

**Relação entre a via de sinalização da leptina e a progressão de
carcinomas papilíferos de tireoide em crianças e adolescentes**

Rio de Janeiro

2014

Mario Lucio Cordeiro Araujo Junior

Relação entre a via de sinalização da leptina e a progressão de carcinomas papilíferos de tireoide em crianças e adolescentes

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Coorientadora: Prof^a. Dra. Albanita Viana de Oliveira

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A658 Araújo Junior, Mario Lucio Cordeiro.
Relação entre a via de sinalização da leptina e a progressão de
carcinomas papilíferos de tireoide em crianças e adolescentes
/ Mario Lucio Cordeiro Araújo Junior. – 2014
62 f.

Orientador: Egberto Gaspar de Moura.

Coorientadora: Albanita Viana de Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia
Clínica e Experimental.

1. Tireoide - Câncer - Teses. 2. Neoplasias da Glândula Tireoide. 3.
Leptina - Teses. 4. Imunofluorescência - Teses. I. Moura, Egberto
Gaspar de. II. Oliveira, Albanita Viana de. III. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.441-006.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mario Lucio Cordeiro Araujo Junior

Relação entre a via de sinalização da leptina e a progressão de carcinomas papilíferos de tireoide em crianças e adolescentes

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de dezembro de 2014.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Albanita Viana de Oliveira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Marisa Maria Dreyer Breitenbach
Instituto Nacional de Câncer

Prof.^a Dra. Rossana Corbo Ramalho de Mello
Instituto Nacional de Câncer

Prof.^a Dra. Vera Lucia Nunes Pannain
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às crianças e adolescentes que, nessa fase tão valiosa da existência humana, tiveram que abrir mão de muitas coisas para lutar contra o câncer.

AGRADECIMENTOS

À Denise e Theodoro, por exercerem o papel de família de maneira brilhante.

À minha mãe Sandra, irmã Irene, cunhado Marcos e sobrinhos Ygor e Yngrid, por me darem o suporte que preciso sempre.

Aos orientadores Professor Egberto Moura e Professora Albanita Viana, pelo altruísmo e eficiência na formação de cientistas brasileiros, e pela especial atenção dedicada a este trabalho.

Ao Frederico Campos, amigo, irmão e sócio, que abrilhantou este trabalho com sua competência.

À Viviane Rapozo e Nayara Peixoto, por me surpreenderem com a capacidade de trabalhar em equipe, me ensinando que o excelente é alcançável.

Ao Alexandre Plastino, que ocupa um lugar enorme no coração da minha família, por se dispor a revisar o texto e formatação deste trabalho.

Às Professoras Patricia Lisbôa e Elaine de Oliveira, por sempre terem comentários que tornam os resultados mais claros.

Ao Fernando Carlos, por ter colaborado na obtenção dos artigos de referência deste trabalho e por contribuir para que eu me mantenha na dieta e no exercício físico.

À Marcelli Gatto, por ter dado assistência técnica no preparo das lâminas com muita destreza, como de costume.

Ao Marcel Quintana, por ter se empenhado na análise estatística dos dados e pela paciência de explicá-los quantas vezes fossem necessárias.

À equipe da Seção Integrada de Tecnologia em Citopatologia/INCA, por serem funcionários queridos e competentes.

À Rosemary Nascimento e equipe do Laboratório HE, por acreditarem e investirem nos meus projetos profissionais.

À Ivanir Martins, chefe da Divisão de Patologia/INCA e demais funcionários, sempre prontos a colaborar.

Aos professores e técnicos do Serviço de Anatomia Patológica da UERJ, por sempre me fazerem sentir como se ainda estivesse em casa.

Aos meus irmãos e conservos da Comunidade S1-RJ, por compartilharem a fé de maneira autêntica e profunda.

Assim resplandeça a vossa luz diante dos homens, para que vejam as vossas boas obras e glorifiquem o vosso Pai, que está nos céus.

Mateus 5:16

RESUMO

ARAÚJO JUNIOR, Mario Lucio Cordeiro. *Relação entre a via de sinalização da leptina e a progressão de carcinomas papilíferos de tireoide em crianças e adolescentes*. 2014. 62 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna mais comum de glândula endócrina e tem sua incidência aumentada em vários países, inclusive o Brasil, nos últimos anos. Em crianças e adolescentes, o câncer de tireoide é raro, correspondendo a cerca de 2% dos casos, sendo o carcinoma papilífero o tipo histológico mais frequente. O prognóstico de crianças e adolescentes com câncer de tireoide é excelente, com taxas de sobrevivência superiores a 95%. Contudo, quando diagnosticada, essa parcela da população apresenta características clínico-patológicas de doença avançada, como invasão de cápsula e extensão extratireoidiana, além de metástase linfonodal. A leptina é um hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo, participando da regulação da ingestão de alimentos e do gasto energético e tem sido associada a fator prognóstico de alguns tumores, como hematológicos, pancreático, câncer de mama e tireoide. Há relatos deste hormônio atuar como fator angiogênico e mitogênico. O objetivo deste estudo é avaliar a associação entre o carcinoma papilífero de tireoide em crianças e adolescentes e proteínas da via de sinalização da leptina, através de imunofluorescência para ObR (receptor de leptina), pJAK2 e pSTAT3, relacionando com dados que apontam para o prognóstico da doença. Foram incluídos no estudo 52 pacientes, sendo a expressão e o padrão de marcação avaliados por consenso entre dois patologistas. O perfil de marcação foi puntiforme e multifocal para o tecido não neoplásico adjacente como para o tecido tumoral. Foram atribuídos scores para a imunomarcação (1-10% e >10%) e analisadas possíveis associações entre ObR, pJAK2 e pSTAT3 com variáveis demográficas qualitativas ou características clínico-patológicas. Todos os casos apresentaram marcação relevante (>10%) no tecido não-neoplásico para as 3 proteínas, enquanto no tecido neoplásico, houve marcação em 53% dos casos para ObR, 47% para pJAK2 e 71% para pSTAT3. ObR foi 6,2 vezes mais frequente em pacientes sem metástase linfonodal. O tamanho do tumor foi inversamente relacionado com marcação relevante para pJAK2 e pSTAT3. Nossos achados mostram que ObR está relacionado a menos metástase linfonodal e pJAK-pSTAT3 com tamanho tumoral reduzido, sugerindo que a via de sinalização da leptina em câncer de tireoide de crianças e adolescentes pode contribuir para prevenir o aumento da tumorigênese.

Palavras-chave: Carcinoma papilífero de tireoide. Leptina. Criança e adolescente. Metástase. Imunofluorescência.

ABSTRACT

ARAUJO JUNIOR, Mario Lucio Cordeiro. *The relationship between the leptin signaling pathway and the progression of thyroid papillary carcinomas in children and adolescents*. 2014. 62 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Thyroid cancer is the most common endocrine gland neoplastic malignancy and its incidence has increased in many countries in recent years, Brazil included. Thyroid cancer is rare in children and adolescents and it accounts for 2% of the cases. Its histologically more frequent type is papillary carcinoma. The prognosis in this population is excellent, with survival rates superior to 95%. However, when diagnosed, this part of the population has clinical and pathological characteristics of advanced disease, such as capsular invasion, extrathyroidal extension and lymph node metastasis. Leptin is a hormone produced mainly by adipose tissue, participating in the regulation of food uptake and energy expenditure and it has been associated with the prognostic factor of hematologic, pancreas, breast and thyroid tumors. There are reports about the action of this hormone as an angiogenic and mitogenic factor. The goal of this study is to assess the association between thyroid papillary carcinoma in children and adolescents and the leptin signaling pathway proteins through ObR, pJAK2 and pSTAT3 immunofluorescence, related to data that point to the prognosis of the disease. This study included 52 patients and the expression and staining were assessed in consensus by two pathologists. The staining profile was punctiform and multifocal for both the non-neoplastic adjacent tissue as well as the tumor tissue. Scores were assigned for immunostaining (1-10% and >10%) and possible associations among ObR, pJAK2 and pSTAT3 were analyzed, with qualitative demographic variables or clinical and pathological features. All the cases presented relevant staining (>10%) in the non-neoplastic tissue for the three proteins while in the neoplastic tissue there was staining for ObR in 53% of the cases, 47% for pJAK2 and 71% for pSTAT3. ObR was 6.2 times more frequent in patients without lymph node metastasis. The tumor size was inversely related to relevant staining for pJAK2 and pSTAT3. This study shows that ObR is related to less lymph node metastasis and pJAK-pSTAT3 to smaller tumor size, suggesting that the leptin signaling pathway in thyroid cancer in children and adolescents may play an important role in the prevention of tumorigenesis.

Keywords: Papillary thyroid cancer. Leptin. Children and adolescents. Metastasis. Immunofluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Achados cito e histopatológicos do carcinoma papilífero de tireoide	17
Figura 2 –	Achados histopatológicos do carcinoma folicular de tireoide	18
Figura 3 –	Achados histopatológicos do carcinoma medular de tireoide	19
Figura 4 –	Achados histopatológicos do carcinoma anaplásico de tireoide	20
Figura 5 –	Via de sinalização da leptina	24
Figura 6 –	Perfil de marcação para ObR no tecido tireoidiano normal e neoplásico	35
Figura 7 –	Perfil de marcação para pJAK2 no tecido tireoidiano normal e neoplásico	36
Figura 8 –	Perfil de marcação para pSTAT3 no tecido tireoidiano normal e neoplásico	37
Figura 9 –	Proporções de características histopatológicas indicadoras de agressividade de doença nos pacientes do estudo	41
Figura 10 –	Histograma do tamanho do tumor para os diferentes níveis de pJAK2 (1-10% e >10)	45
Figura 11 –	Histograma do tamanho do tumor para os diferentes níveis de pSTAT3 (1-10% e >10)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Risco relativo de diferentes tipos de câncer associados à obesidade	27
Tabela 2 –	Características dos anticorpos primários utilizados no estudo	32
Tabela 3 –	Características dos anticorpos secundários utilizados no estudo ..	33
Tabela 4 –	Frequências absolutas e relativas das de ObR, pSTAT3, pJAK2 ..	38
Tabela 5 –	Frequências absolutas e relativas das de ObR, pSTAT3, pJAK2 e demais variáveis demográficas e clínicas dos pacientes	38
Tabela 6 –	Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de ObR (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado	42
Tabela 7 –	Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de pJAK2 (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado	43
Tabela 8 –	Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de pSTAT3 (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado	45
Tabela 9 –	Razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas no Modelo Linear Generalizado multivariado com desfecho ObR (1-10% e >10%)	48
Tabela 10 –	Razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas no Modelo Linear Generalizado multivariado com desfecho pJAK2 (1-10% e >10%)	49
Tabela 11 –	Razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas no Modelo Linear Generalizado	

multivariado com desfecho pSTAT3 (1-10% e >10%) 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
HE	Hematoxilina & Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JAK2	<i>Janus-activated kinase 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activator protein kinase</i>
NEM	Neoplasia Endócrina Múltipla
ObR	Receptor de Leptina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI3K	<i>Phosphatidyl inositol 3-kinase</i>
SOCS3	<i>Supressor of cytokine signaling 3</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TPO	Tireoperoxidase
TSH	<i>Thyroid-stimulating Hormone</i> (Hormônio estimulador da tireoide)
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1	Câncer de tireoide	14
1.1.1	<u>Carcinoma papilífero</u>	15
1.1.2	<u>Carcinoma folicular</u>	17
1.1.3	<u>Carcinoma medular</u>	18
1.1.4	<u>Carcinoma anaplásico</u>	20
1.2	Câncer de tireoide em crianças e adolescentes	21
1.3	Leptina e sua via de sinalização	22
1.4	Tireoide e leptina	25
1.5	Obesidade, leptina e câncer	27
1.6	Leptina e câncer de tireoide	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Geral	30
2.2	Específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	50
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO

A tireoide é um importante órgão endócrino, responsável pela regulação do metabolismo, através da síntese e liberação de seus hormônios, em especial tiroxina (T4) e triiodotironina.

O câncer de tireoide apresenta incidência crescente em vários países do mundo, até mesmo no Brasil. Na última listagem, publicada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), de neoplasias malignas mais frequentes em nossa população, o carcinoma de tireoide ocupa a 5ª colocação no *ranking* de neoplasias no sexo feminino (INCA, 2014).

Apesar de raro em crianças e adolescentes, quando acometidos pelo carcinoma de tireoide, costumam se apresentar em estágios mais avançados da doença, porém apresentam bom prognóstico após tratamento cirúrgico e complementar. Porém, há poucos dados na literatura referentes à neoplasia de tireoide nessa população.

Outra constatação em saúde pública é a recente epidemia de obesidade, atraindo a atenção de pesquisadores para fenômenos genéticos, ambientais e fisiopatológicos para explicar este fenômeno.

A leptina é um hormônio produzido e liberado principalmente pelo tecido adiposo, e participa da regulação da ingestão alimentar e gasto de energia. Este hormônio encontra-se aumentado na circulação de obesos, mas paradoxalmente seu efeito está diminuído, por estes indivíduos apresentarem menor sinalização deste hormônio. Há na literatura dados apontando ainda para uma ação mitogênica e angiogênica, atribuindo a esse hormônio um fator prognóstico em diversos tipos de câncer, com possível participação no processo carcinogênico.

Baseado nesses dados e devido à escassez de informação na literatura sobre fatores prognósticos da progressão do câncer de tireoide, em especial nas crianças e adolescentes, consideramos esse trabalho relevante pois pretende avaliar a associação da leptina e proteínas de sua via de sinalização com carcinoma papilífero de tireoide nessa população, comparando-os com aspectos clínico-patológicos, considerando-se o paralelo entre o aumento da prevalência de câncer de tireoide e obesidade.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Câncer de tireoide

O câncer da tireoide é considerado raro na maioria das populações mundiais, representando entre 2% a 5% do total de neoplasias malignas em mulheres e menos de 2% em homens. O câncer de tireoide é a neoplasia de glândula endócrina mais comum no mundo, sendo a 5ª neoplasia mais comumente diagnosticada em mulheres, com aproximadamente 60.000 novos casos em 2013 (Cristofano, 2013). No Brasil, em 2014, são estimados 1.150 casos novos de câncer de tireoide para o sexo masculino e 8.050 casos para o sexo feminino, com um risco estimado de 1,15 casos a cada 100 mil homens e 7,91 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de tireoide, em homens, é o 13º mais incidente nas regiões Sul (3,43/100.000) e Nordeste (1,29/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (1,29/100.000), Norte (0,65/100.000) e Sudeste (0,43/100.000), é o 14º mais frequente. Nas mulheres, é o 4º mais frequente na região Sul (16,15/100.000) enquanto nas regiões Sudeste (7,89/100.000), Nordeste (5,68/100.000) e Norte (3,49/100.000), é o sexto. Já na região Centro-Oeste (4,46/100.000), é o nono mais frequente (INCA, 2014).

Há relatos de que a incidência do câncer de tireoide está aumentando tanto em homens quanto em mulheres em diversos países, incluindo Estados Unidos, Inglaterra, Itália, Lituânia, Canadá e China, sendo que este aumento não é apenas explicado por aumento do escrutínio de pequenos tumores, devido a melhoria dos métodos de imagem e a utilização de biópsia de agulha fina (Zhang et al, 2013).

O uso da ultrassonografia e da biópsia guiada por ultrassonografia, além de exames de imagem não diretamente relacionados ao pescoço, como tomografia computadorizada e ressonância magnética da coluna vertebral ou ultrassonografia vascular, tem contribuído para detecção de tumores pequenos e em estádios iniciais, podendo responder pelo aumento da incidência do câncer de tireoide (Davies & Welch, 2006). Entretanto, este aumento ocorre em tumores de diferentes tamanhos e estádios (Enewold et al, 2009), indicando que a maior incidência não

pode ser completamente explicada pela melhora dos processos de detecção e pode estar relacionada a outros fatores (Dieringer et al, 2014).

O desenvolvimento de tumores das células foliculares tireoidianas é dependente da interação de dois fatores principais: estimulação do crescimento e mutagênese (Williams, 1995). Sua etiologia é relacionada a fatores ambientais, genéticos e hormonais, sendo a radiação o fator genotóxico mais bem documentado, historicamente exemplificado pelo acidente nuclear em Chernobyl (Loyd et al, 2011).

As mulheres são mais comumente acometidas pelo carcinoma de tireoide que os homens, numa proporção de 2-4:1, sendo o carcinoma papilífero o mais frequente, correspondendo a mais de 80% dos casos (Zhang et al, 2013). Há outros tipos menos frequentes de carcinomas da tireoide, como carcinoma folicular, medular, pouco diferenciado e anaplásico.

1.1.1 Carcinoma papilífero de tireoide

O tipo mais comum de câncer de tireóide é o carcinoma papilífero. Apesar do carcinoma papilífero poder acometer qualquer faixa etária, é mais prevalente entre 20 e 50 anos, e sua agressividade aumenta significativamente com a idade (Khanafshar & Lloyd, 2011).

Os pacientes acometidos por essa neoplasia tendem a ter sobrevida alta e uma progressão indolente. Fatores de pior prognóstico incluem idade avançada ao diagnóstico, sexo masculino, grande tamanho tumoral e extensão extratireoidiana. Um prognóstico ainda mais reservado é observado naqueles pacientes que apresentam invasão vascular, áreas tumorais sólidas ou menos diferenciadas e aneuploidia cromossômica. Metástases a distância, para pulmão e ossos, ocorrem em 5% a 7% dos casos (Livolsi, 2011).

O método mais comum de examinar um nódulo de tireoide único é a punção aspirativa por agulha fina, podendo-se inclusive dar-se o diagnóstico a partir de punção de linfonodo cervical palpável, metastático (Loyd et al, 2011).

Macroscopicamente, os carcinomas papilíferos são usualmente firmes, com superfície de corte brancacenta e bordas irregulares, com ocasionais depósitos de

calcificação. Podem ser encapsulados, especialmente na variante folicular (Khanafshar & Lloyd, 2011).

Microscopicamente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu os critérios diagnósticos dependendo fundamentalmente das características nucleares. As alterações nucleares que podem ser encontradas são: (1) núcleos aumentados e alongados, podendo estar amontoados e sobrepostos; (2) irregularidade do contorno nuclear; (3) cromatina clara de aspecto vazado com reforço periférico, sendo chamada de “Olhos da órfã Annie”; (4) múltiplos nucléolos justapostos à membrana nuclear; (5) arranhaduras nucleares resultantes do contorno nuclear irregular visto em duas dimensões e (6) pseudoinclusões citoplasmáticas intranucleares (Al-Brahim & Asa, 2006) (Figura 1A e B).

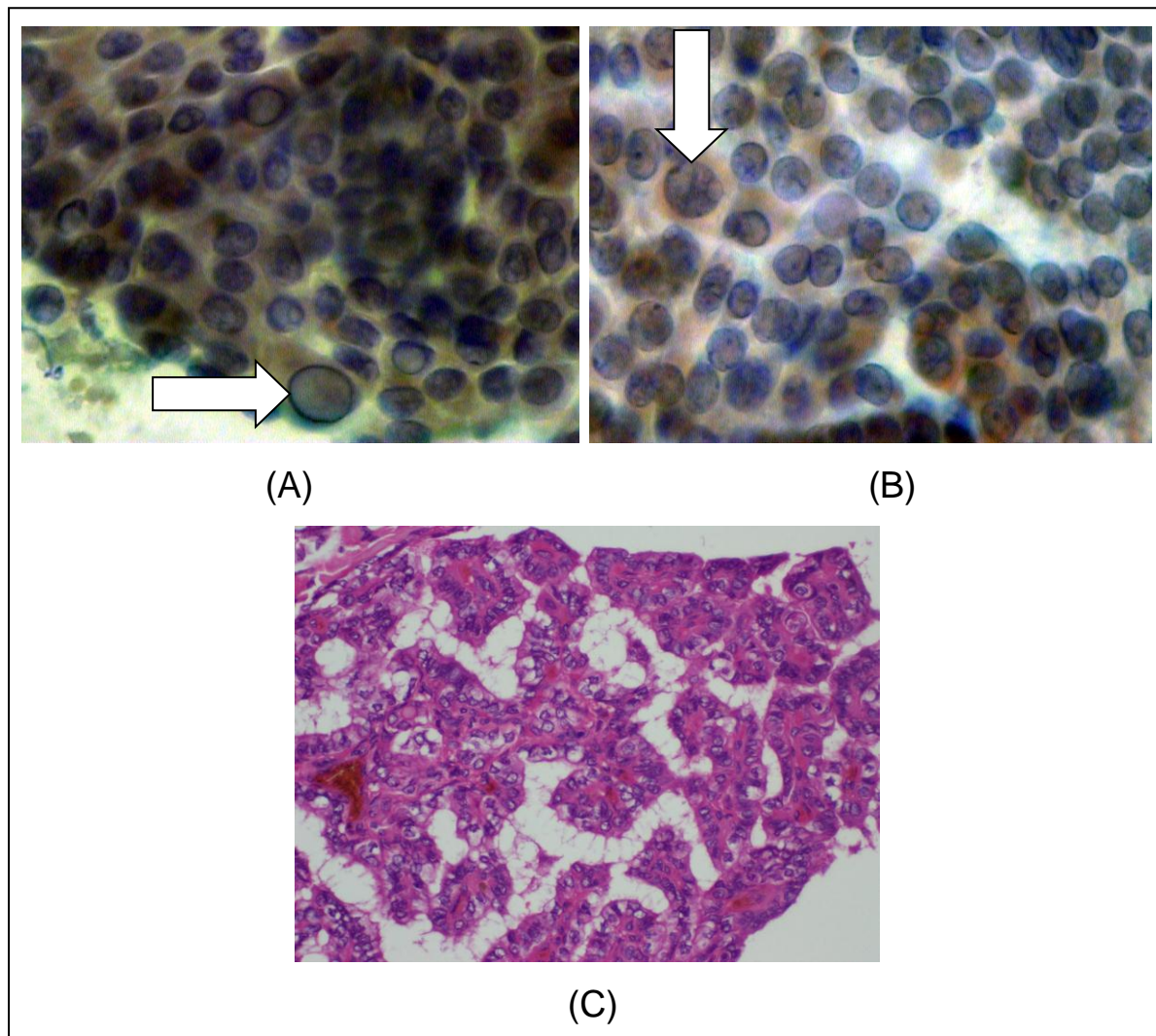
A variante clássica do carcinoma papilífero apresenta papilas contendo um eixo fibrovascular central recoberto por uma ou mais camadas de células malignas cuboidais e colunares com citoplasma eosinofílico (Figura 1C). Corpos de psamomas são frequentes, sendo caracterizados por calcificações lamelares concêntricas (Al-Brahim & Asa, 2006).

Há diversas variantes do carcinoma papilífero descritas na literatura, algumas com importância prognóstica, sendo importante diferenciá-las do carcinoma papilífero clássico. A classificação de tumores de tireoide da OMS reconhece uma subcategoria de variantes biologicamente mais agressivas que incluem as variantes esclerosante difusa, "tall-cell", e variante colunar (Khanafshar & Lloyd, 2011).

Há autores que consideram as variantes oncocítica, sólida e trabecular como variantes com prognóstico variável. As variantes folicular, macrofolicular, pseudo-Warthin, células claras e com reação estromal linfocítica têm prognóstico semelhante à variante clássica do carcinoma papilífero (Silver et al, 2011).

Já o microcarcinoma papilífero da tireóide apresenta as mesmas alterações nucleares, entretanto, a medida no seu maior eixo não ultrapassa 1,0 cm. Provavelmente representa a forma inicial do carcinoma papilífero que se desenvolveria caso o diagnóstico não fosse realizado precocemente, conferindo um excelente prognóstico (Park *et al*, 2010).

Figura 1 – Achados cito e histopatológicos do carcinoma papilífero de tireoide



Legenda: A e B – Achados citopatológicos do carcinoma papilífero de tireoide, observando-se (em A) anisocariose, empilhamento nuclear e pseudoinclusões nucleares (seta) e (em B) arranhaduras nucleares (seta). Papanicolaou (x40); C – Achado histopatológico observando-se neoplasia constituída por papilas contendo um eixo fibrovascular central recoberto por uma ou mais camadas de células malignas. HE (x20).

Fonte: ARAUJO JR, 2014 (Gentilmente cedido por Laboratório de Patologia HE).

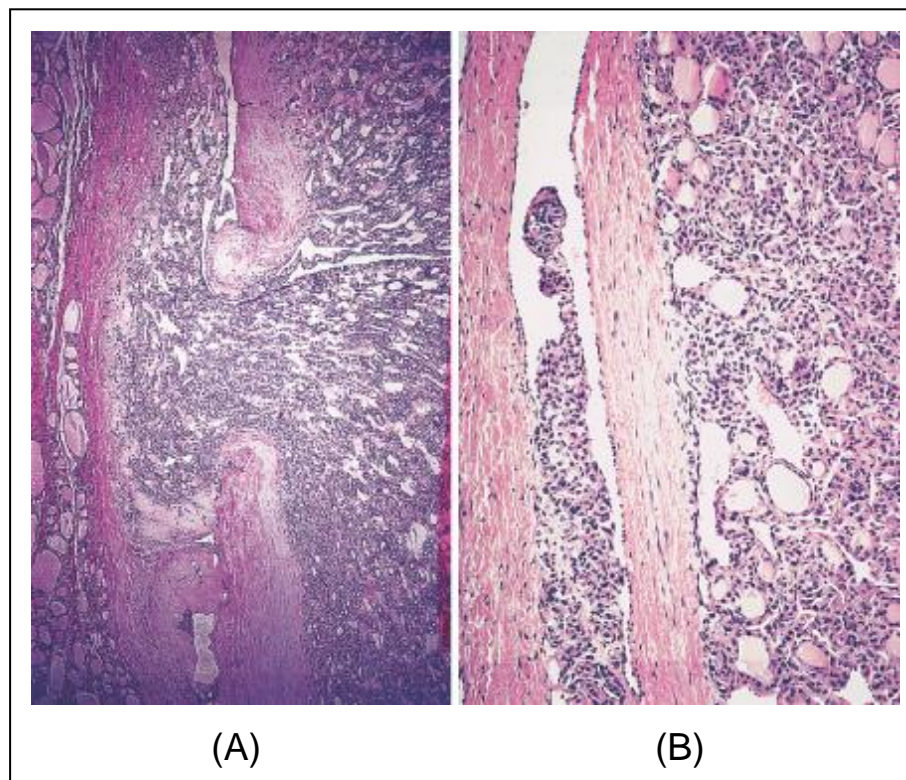
1.1.2 Carcinoma folicular

O carcinoma folicular é definido como tumor epitelial maligno com diferenciação folicular sem critérios nucleares diagnósticos de carcinoma papilífero da tireóide segundo a OMS. Microscopicamente o carcinoma folicular da tireóide possui aspectos similares ao adenoma folicular. Entretanto, o carcinoma folicular

tende a ser mais celular com cápsula espessa e irregular e com áreas de necrose e as mitoses são mais frequentes (Sobrinho-Simões *et al*, 2011).

O carcinoma folicular e o adenoma folicular não podem ser distinguidos com base somente na citologia. Sua distinção é feita com base na presença de invasão capsular, invasão vascular, extensão tumoral extratireoidiana e metástases linfonodal ou sistêmica (Figura 2). A invasão capsular é definida quando o tumor estende-se por toda a espessura da cápsula. Apesar disso, a invasão vascular é um sinal mais confiável de malignidade (Suster, 2006).

Figura 2 – Achados histopatológicos do carcinoma folicular de tireoide



Legenda: Invasão capsular (A) e vascular (B) em carcinoma folicular.
Fonte: Adaptado de ROSAI, 2004.

1.1.3 Carcinoma medular da tireoide

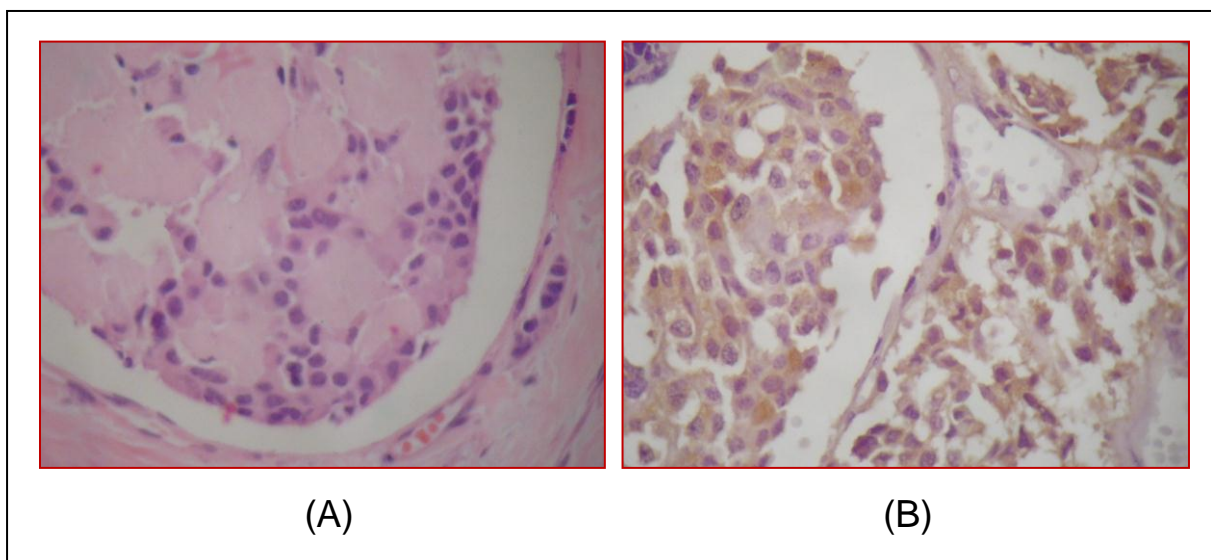
O carcinoma medular da tireoide é uma neoplasia maligna das células C, produtoras de calcitonina, e compreende de 5% a 10% dos cânceres desse órgão. A idade média ao diagnóstico é de 50 anos. Entretanto, quando relacionados com

neoplasias endócrinas múltiplas (NEM) acometem crianças e adolescentes. Os pacientes podem apresentar síndromes paraneoplásicas em decorrência da produção de calcitonina e de outros peptídeos, amina e adrenocorticotropina. Os tumores mais volumosos são associados à diarreia, rubores e síndrome de Cushing (Matias-Guiu et al, 2004).

Esses tumores tendem a fazer metástase precocemente, principalmente para linfonodos cervicais. Metástases à distância são encontradas em aproximadamente 20% dos pacientes. Os sítios mais frequentes são fígado, pulmão e ossos.

Caracteristicamente apresentam arquitetura em ninhos ou trabéculas separados por graus variados de estroma fibrovascular, dando configuração lobular (organóide) ou trabecular. Infiltração linfática pelas células tumorais é vista com frequência. O estroma tumoral é variado, sendo ricamente vascularizado em alguns casos e com abundante matriz colágena hialinizada. Depósito de material amilóide é visto em 50% a 70% dos casos (Matias-Guiu et al, 2004) (Figura 3).

Figura 3 – Achados histopatológicos do carcinoma medular de tireoide



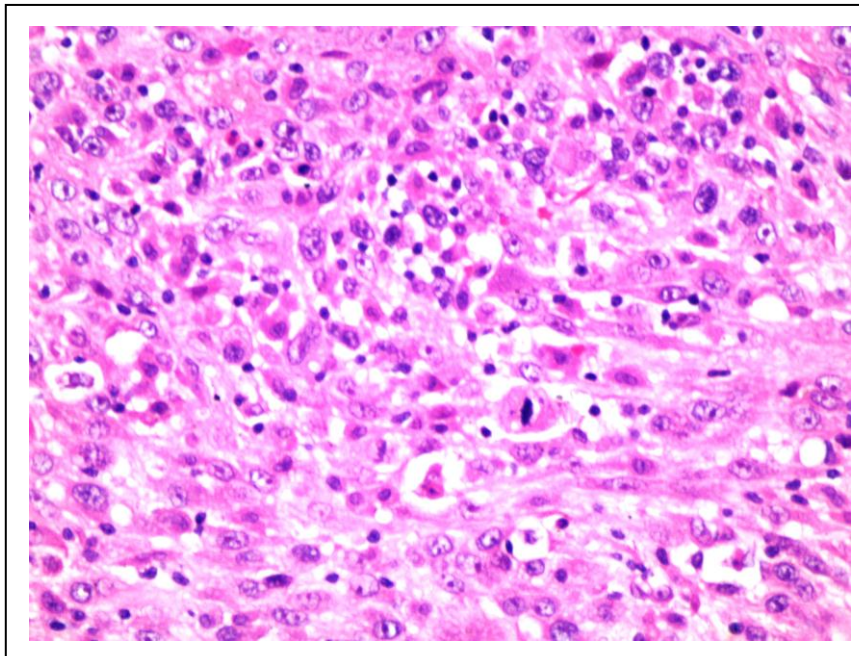
Legenda: A – Neoplasia de padrão organóide, contendo células ovais com núcleos exibindo cromatina granular e citoplasma plasmocitóide, em meio a substância amiloide. B – Marcação imunohistoquímica para calcitonina.

Fonte: Arquivo INCA, 2011.

1.1.4 Carcinoma anaplásico de tireoide

A importância de reconhecer o carcinoma anaplásico de tireóide, apesar de ser raro, se deve ao fato de possuir um curso clínico agressivo e um pior prognóstico. Corresponde a cerca de 4% a 7% de todos os cânceres de tireóide. No momento do diagnóstico, são tumores avançados com tendência a recorrência local e metástases para linfonodos regionais, pulmão e ossos (Bongiovanni et al, 2009).

Figura 4 – Achados histopatológicos do carcinoma anaplásico de tireoide



Legenda: Observa-se acentuado pleomorfismo celular, com figuras de mitose atípicas (seta).
Fonte: Arquivo UERJ, 2012.

Nos cortes histológicos, os carcinomas de tireóide pouco diferenciados podem apresentar o padrão arquitetural insular com as células agrupadas em grupos ou em ninhos ou não insular. Nesse último, assume aspecto trabecular ou sólido (Bongiovanni et al, 2009). As figuras de mitose são frequentes, assim como áreas de necrose, hemorragia, invasão vascular e pleomorfismo nuclear acentuado (Patel & Shaha, 2006) (Figura 4).

1.2 Câncer de tireoide em crianças e adolescentes

Nódulos de tireoide são relatados em torno de 1,0 a 1,5% das crianças e, assim como em adultos, a maioria é benigno. Porém, indivíduos muito jovens, a deficiência de iodo, a terapia com radiação na região da cabeça e pescoço e possivelmente tireoidite auto-imune aumentam o risco de um nódulo tireoidiano ser maligno (Dinauer & Francis, 2007), sendo o câncer de tireoide a neoplasia de glândula endócrina mais comum da infância (Hogan et al, 2009).

Quando comparados com adultos, crianças tem risco de malignidade quatro vezes maior quando um nódulo de tireoide é diagnosticado (Vaisman et al, 2011).

A ocorrência de carcinoma em crianças e adolescentes é rara, correspondendo a cerca de 2% dos casos. (INCA, 2009). O carcinoma diferenciado de tireóide é infrequente nessa população, tendo sua incidência aumentada sensivelmente após o acidente nuclear de Chernobyl, em 1986 (Bard et al, 1997), sendo o comportamento biológico diverso em adultos e em indivíduos menores de 18 anos.

A idade é reconhecida como um dos fatores prognósticos mais importantes do carcinoma diferenciado da tireóide. Pacientes com idade inferior aos 40 anos apresentam períodos mais longos de sobrevida e menor incidência de recorrência (Dottorini et al, 1997). Contudo, quando diagnosticados, crianças e adolescentes estão em estágios mais avançados da doença, com extensão local em 20 a 60%, envolvimento de linfonodos cervicais em 40 a 80% e metástases pulmonares em 20% dos casos (Lazar et al, 2009).

As características do câncer de tireoide em crianças são bem documentadas, sendo o carcinoma papilífero o tipo histológico mais freqüente, com prevalência variando de 68 a 93% (Harach & Williams, 1995; Harness et al, 1992). Contudo, o prognóstico de crianças e adolescentes com carcinoma papilífero de tireoide é excelente, com taxas de sobrevida superiores a 95% (Newman et al, 1998), mesmo com apresentação clínica menos favorável, já que apresentam tumores de maior volume, a multicentricidade é mais frequente e a probabilidade de metástases linfonodal e à distância são maiores que na população adulta (Vaisman et al, 2011) Apesar do prognóstico favorável, há recorrência de doença em 10-20% dos pacientes (Sassolas et al, 2013).

Existem poucos estudos na literatura sobre o carcinoma de tireoide em crianças. A maioria dos trabalhos científicos aborda dados clínico-patológicos ou de sobrevivência relacionados a essa doença. Contudo, ainda não há informações científicas relevantes que comprovem ou contribuam para o entendimento dessa forma peculiar de apresentação do carcinoma de tireoide ao acometer essa parcela da população.

Lazar et al (2009) sugerem que o diâmetro menor da tireoide (< 1cm) em pacientes jovens contribui para a disseminação rápida do tumor na cápsula tireoidiana e tecidos adjacentes, assim como o diagnóstico tardio. Faggiano et al (2004) consideram que os folículos tireoidianos são metabolicamente mais ativos em crianças menores de 12 anos, facilitando a extensão extra-tireoidiana precoce em pacientes pré-púberes.

1.3 Leptina e sua via de sinalização

Durante as últimas décadas, tem se reconhecido que o tecido adiposo exerce funções importantes além de ser reservatório energético, como secretar uma variedade de hormônios com efeitos endócrino, parácrino e autócrino; citocinas e fatores de crescimento que influenciam o tecido adiposo local e diferentes órgãos/tecidos (Cinar & Gurlek, 2013)

A leptina é produzida e liberada no sistema circulatório principalmente pelo tecido adiposo, participando da regulação da ingestão de alimentos e gasto de energia (Ahima & Flier, 2000; Zhang et al, 1994).

Há estudos confirmando que outros tecidos também expressam leptina, como placenta, ovários, músculo esquelético e estômago (Margetic et al, 2002). Vários genes já foram identificados para revelar um sistema fisiológico que mantém o peso corporal, sendo a leptina um produto hormonal de 16-kDa do gene da obesidade *ob*. Em humanos, a leptina é codificada pelo gene 7q31.3, e é semelhante ao hormônio secretado por roedores (Considine & Caro, 1997), e sua expressão é mais presente no tecido subcutâneo que no tecido adiposo de omento. A diferença em nível de RNAm entre os vários sítios de tecido adiposo pode refletir nas diferenças de

tamanho da célula adiposa; quanto maior o adipócito, maior a expressão do gene ob (Van Harmelen et al, 1998).

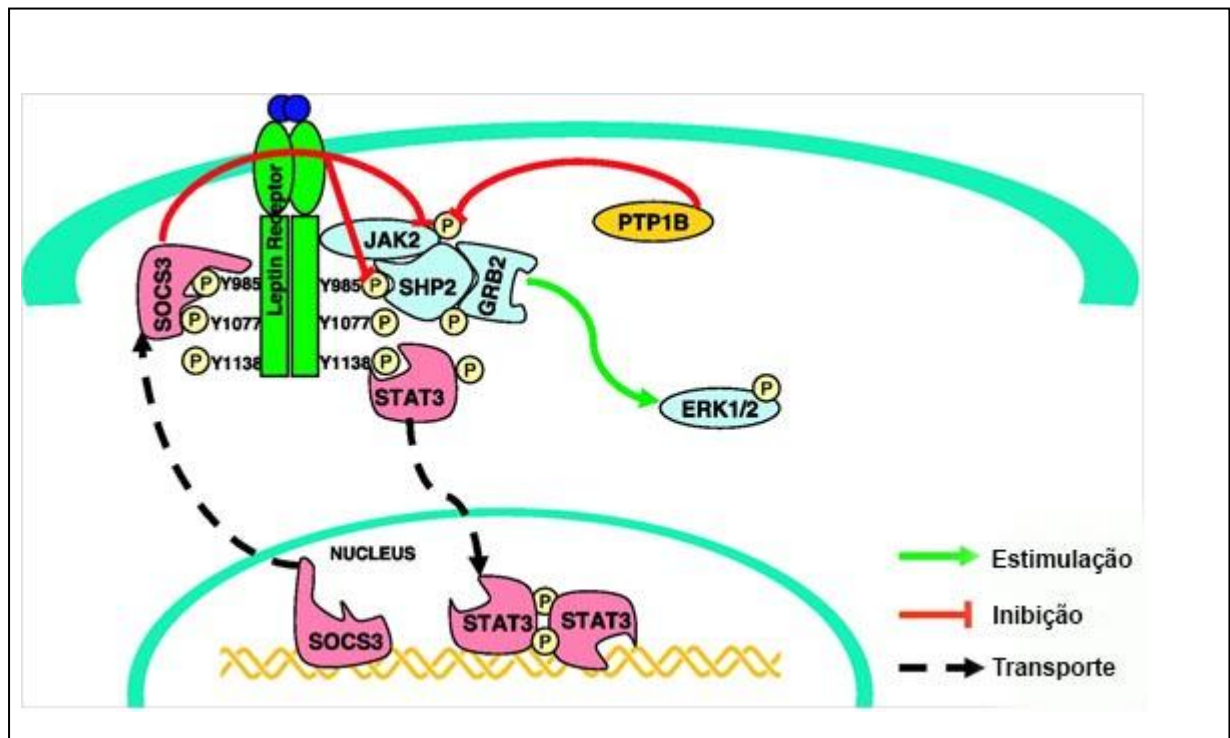
Há aumento da liberação de leptina em estados de hiperalimentação, níveis aumentados de insulina, glicocorticoides, endotoxinas e citocinas. Está diminuída no jejum, em níveis elevados de testosterona, hormônios tireoidianos e exposição a temperaturas frias (Yang & Barouch, 2007; Dutra et al., 2007; Dutra et al., 2011).

A deficiência congênita de leptina, observada em raros casos de mutação no gene da leptina, está associada com hiperfagia, termogênese desregulada, defeitos imunes, resistência à insulina, dislipidemia, lipotoxicidade, hipogonadismo hipogonadotrópico e alterações estruturais ou funcionais cerebrais, todos reversíveis com tratamento com leptina (Paz-Filho et al, 2011).

Os mecanismos envolvidos na resistência à leptina em humanos obesos podem incluir transporte deficiente da leptina no cérebro, e/ou diminuição da sinalização da leptina em nível hipotalâmico, em parte devido a *up regulation* de inibidores específicos da via de sinalização da leptina. A patogênese da resistência à leptina ainda está em intensa investigação, e espera-se que a elucidação dos mecanismos envolvidos na resistência à leptina podem levar ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento da obesidade (Gale et al, 2004).

Os receptores de leptina (ObR) ativam as vias da JAK (*Janus-activated kinase*), STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*), substrato de receptores de insulina e MAPK (*mitogen-activator protein kinase*), sendo JAK/STAT a via mais bem caracterizada. Ao se ligar ao ObR, há homooligomerização e ligação a JAK, primariamente JAK2, levando a autofosforilação de JAK2, e conseqüente fosforilação de resíduos de tirosina no receptor (Tyr985, Tyr1077 e Tyr1138). A fosforilação de Tyr1138 recruta proteínas STAT para o complexo ObR/JAK2. Moléculas de STAT3 fosforiladas se dimerizam e se translocam para o núcleo para ativar a transcrição de genes alvo, incluindo SOCS3, da família de supressores de sinais de citocinas. SOCS3 ao se ligar ao Tyr985 e outros sítios dentro do complexo ObR/JAK2 leva ao feedback negativo da via de sinalização da leptina, por inibição da fosforilação de JAK2 (Figura 5).

Figura 5 – Via de sinalização da leptina



Legenda: A ligação da leptina ao seu receptor leva à formação do complexo ObR/JAK2 resultando em fosforilação cruzada. Tyr1138 no ObR é crucial para ativação de STAT3, que estimula expressão de SOCS3 que negativamente inibe a via de sinalização da leptina via Tyr985 e em outros sítios de JAK2. *Protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP 1B) também é capaz de inibir a via de sinalização da leptina. A fosforilação de JAK2 pode levar a ativação de MAPK e das vias da insulina/PI3K.

Fonte: Modificado de Yang & Barouch 2007.

A isoforma ObRa é expressa no plexo coroide e em vários outros tecidos, podendo exercer a função de transporte da leptina através da barreira hematoencefálica ou formar heterodímeros com outras proteínas de superfície celular. O ObRb é normalmente expresso em altos níveis nos neurônios hipotalâmicos, incluindo células T e células endoteliais (Friedman & Halaas, 1998). O ObRe é a forma solúvel do receptor de leptina transmembrana (Meier & Gressner, 2004).

1.4 Tireoide e leptina

A obesidade tem sido um problema de saúde pública, em especial nos países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, assim como em diversos outros países do mundo, as taxas de obesidade dobraram nos últimos 30 anos (Flegal et al, 2012).

A obesidade infantil tem aumentado nos últimos anos, inclusive no Brasil, onde os dados mais recentes do IBGE constataam um percentual de sobrepeso próximo dos 30% e de obesidade de 11,5% em crianças e adolescentes (ABESO, 2009).

A obesidade tem sido associada a maior prevalência de algumas formas de câncer (Wolin et al, 2010). Há dados epidemiológicos garantindo que a obesidade está independentemente associada a aumento da incidência de tumores sólidos, inclusive o câncer de tireoide (Pappa & Alevizaki, 2014).

Um estudo de meta-análise para observar a relação entre Índice de Massa Corporal (IMC) e incidência de câncer constatou que um aumento de 5kg/m² no IMC está fortemente relacionado ao câncer de tireoide em homens e mulheres, apesar da associação ser menor em mulheres (Renehan et al, 2008).

Diversos estudos avaliaram a interação entre hormônios tireoidianos com os níveis de leptina em pacientes com doenças tireoidianas, sendo os resultados controversos (Sera et al, 2000). Há evidências que os efeitos dos hormônios tireoidianos (triiodotironina – T₃) sobre a produção de leptina possam ser inibitórios (Fain et al, 1997), estimulatórios (Yoshida et al, 1997) ou indiferentes (Mantzoros et al, 1997; Sesmilo et al, 1998).

O estudo de Fain et al (1997) revelou que a administração de T₃ para ratos machos hipotireoideos resultou em diminuição de 40% no RNAm de leptina em 8h. Esse decréscimo no RNAm de leptina estava associado com declínio paralelo dos níveis de leptina circulante em torno de 50% em 24h.

Sesmilo et al (1998) investigaram pacientes com hipotireoidismo e hipertireoidismo retornando à função tireoidiana normal. Pacientes com hipotireoidismo foram tratados com T₄ livre e pacientes com hipertireoidismo com metimazol. O estudo concluiu não haver correlação entre níveis séricos de leptina e níveis dos hormônios da tireoide (T₄ livre e T₃) e TSH em qualquer fase do estudo.

Os hormônios tireoidianos estão envolvidos na regulação do metabolismo corporal. Esses efeitos incluem a estimulação da taxa de metabolismo em repouso, aumento do gasto energético, resposta metabólica a catecolaminas e termogênese em nível do tecido adiposo (Cinar & Gurlek, 2013). Distúrbios da função tireoidiana geram alterações do peso corporal, massa muscular e tecido adiposo. Os receptores de TSH (*Thyroid-stimulating hormone*) já foram identificados no tecido adiposo, indicando que participam da regulação de adipocinas envolvidas na regulação do balanço energético (Endo, 1995).

A presença de receptores de hormônios tireoidianos no tecido adiposo sugere que deve haver interferência direta na atividade tireoidiana para produção de adipocinas (Saito et al, 2005). Estudos de *microarray* revelam que os hormônios tireoidianos regulam 19 genes do tecido adiposo humano, originários de proteínas envolvidas em transdução de sinal, metabolismo lipídico, apoptose e respostas inflamatórias (Viguerie et al, 2002).

Oliveira et al (2013) observaram que T3 aumenta os níveis de expressão de leptina em uma hora (período curto) de tratamento, e esse aumento ocorre diretamente em doses fisiológicas de T3 e indiretamente em dose suprafisiológica, mas ambas dependentes de ativação da via PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase). Essa via participa de ampla variedade de processos celulares, incluindo organização de citoesqueleto, crescimento celular e transformação, e prevenção de apoptose, além de ter papel na diferenciação de linhagens celulares, incluindo de adipócitos (Aubin et al, 2005).

Pacientes com hipotireoidismo ganham peso apesar de terem o apetite diminuído, enquanto pacientes com hipertireoidismo diminuem o peso, apesar do aumento de apetite, o que é consistente com o fato de que hormônios tireoidianos participam do processo de gasto energético (Oge et al, 2005; Zimmermann-Belsing et al, 2005; Nakamura et al, 2000; Yoshida et al, 1998).

Enfim, o distúrbio da função tireoidiana está associado com alterações marcantes tanto do peso corporal quanto do gasto energético, sendo objeto de pesquisa para a participação mútua da leptina e dos hormônios tireoidianos (Feldt-Rasmussen, 2007).

Por outro lado, a leptina apresenta um efeito claramente estimulatório sobre a função tireóidea, estimulando o TRH (Legradi et al.,1997), TSH (Seoane et al., 2000;

Ortiga-Carvalho et al., 2002), T3 e T4 (Nowak et al., 2002), captação de radioiodeto pela tireoide (Oliveira et al., 2007), e desiodases (Lisboa et al., 2003).

1.5 Obesidade, leptina e câncer

As associações entre obesidade e diabetes tipo 2 ou doenças cardiovasculares tem sido amplamente estudadas. Contudo, recentemente tornou-se mais clara a associação entre obesidade e o aumento da frequência de diversos tipos de câncer (Tabela 1). Dados epidemiológicos revelam uma associação estatisticamente significativa entre índice de massa corporal e neoplasias malignas hematológicas, pancreáticas, câncer de mama pós-menopausa e tireoide (Khandekar et al, 2011; Cristofano, 2013).

Tabela 1 – Risco relativo de diferentes tipos de câncer associados à obesidade

Tipo de câncer	Homens (95% CI)	Mulheres (95% CI)
Mama	ND	1.12 (1.08–1.16)
Cólon	1.24 (1.20–1.28)	1.09 (1.05–1.13)
Endometrial	NA	1.59 (1.50–1.68)
Esôfago	1.52 (1.33–1.74)	1.51 (1.31–1.74)
Rim	1.24 (1.15–1.34)	1.34 (1.25–1.43)
Leucemia	1.08 (1.02–1.14)	1.17 (1.04–1.32)
Melanoma	1.17 (1.05–1.30)	0.96 (0.92–1.01)
Mieloma	1.11 (1.05–1.18)	1.11 (1.07–1.15)
Linfoma não-Hodgkin	1.06 (1.03–1.09)	1.07 (1.00–1.14)
Pancreático	1.07 (0.93–1.23)	1.12 (1.02–1.22)
Próstata	1.03 (1.00–1.07)	NA
Retal	1.09 (1.06–1.12)	1.02 (1.00–1.05)
Tireóide	1.33 (1.04–1.70)	1.14 (1.06–1.23)

Fonte: Modificado de Khandekar et al, 2011.

Os níveis de leptina são estreitamente relacionados com adiposidade em humanos, e estudos subsequentes sugerem que este hormônio pode estar

associado com aumento da incidência de câncer em indivíduos obesos (Khandekar et al, 2011).

Além de suas funções fisiológicas no sistema nervoso central e na periferia, a leptina pode agir como um fator mitogênico e angiogênico (Garofalo & Surmacz, 2006, Paz-Filho et al, 2011), sendo já descritas maior expressão da leptina e/ou de seu receptor (ObR) em vários tipos de tumores, como carcinoma de endométrio (Yuan et al, 2004; Koda et al, 2007), colo-retal (Paik et al, 2009), mama (Ishikawa et al, 2004; Garofalo et al, 2006) e do estômago (Hong et al, 2006; Zhao et al, 2007).

Evidências sugerem que a leptina exerce efeitos múltiplos na patogênese de células malignas, incluindo estimulação do crescimento de células tumorais, migração e aumento da angiogênese (Uddin et al, 2009; Hedayati et al, 2011). Há também referências de que a leptina tem efeito mitogênico direto em células T CD4 humanas (Lord et al, 1998), além de ação direta em células endoteliais, aumentando a angiogênese, porém relacionadas a altas doses do hormônio (Sierra-Honigmann et al, 1998). Além disso, por ser descrito como um hormônio pleiotrópico, a leptina atua também como fator pró-inflamatório e anti-apoptótico, sendo seu papel na patogênese do câncer amplamente investigado (Paz-Filho et al, 2011), mas não no câncer de tireoide, onde poucos artigos foram publicados sobre o tema e nenhum especificamente com câncer de tireoide em adolescentes e crianças.

1.6 Leptina e câncer de tireoide

A associação entre a concentração sérica de leptina e risco de câncer de tireoide não é bem documentada (Uddin et al, 2011). Há dados na literatura demonstrando níveis elevados de leptina sérica em pacientes com câncer de tireoide, com decréscimo destes níveis após a tireoidectomia e consequente associação da leptina com a carcinogênese do carcinoma papilífero de tireoide (Akinci et al, 2009).

Cheng et al (2010) estudaram a expressão de leptina e receptor de leptina em carcinomas papilíferos de tireoide, 49 primários e 15 metastáticos para linfonodos, através de método imuno-histoquímico, e concluíram que ambos estão associados à agressividade da neoplasia, incluindo o tamanho do tumor e metástases para

linfonodos cervicais. Houve marcação imuno-histoquímica nos tecidos de carcinoma papilífero, mas não em tecido folicular tireoidiano normal. Estes, portanto, são dados importantes e desafiadores para melhor compreender o perfil do carcinoma de tireoide em crianças e adolescentes, já que freqüentemente apresentam tumores volumosos e com metástases nodais cervicais.

Uddin et al (2010) realizaram marcação imuno-histoquímica numa série de 536 carcinomas papilíferos de tireoide. Houve expressão de ObR em 80% dos casos de carcinoma e em 37% no tecido tireoidiano adjacente. Eles mostraram que a maior expressão de ObR estava associada a extensão extratiroidea, maior tamanho do tumor, metastase linfonodal, e menor tempo de sobrevivência sem a doença.

Zhang et al (2013) publicaram recentemente um estudo no qual examinaram a expressão de leptina e de ObR em 76 carcinomas papilíferos de tireoide utilizando imuno-histoquímica. Houve expressão de ObR em 73,7% dos casos e de leptina em 72,4%. Houve associação da marcação de ambos apenas com maior tamanho tumoral.

Dieringer et al (2014) ao estudarem se a epidemia da obesidade se relaciona com tamanho do tumor de tireoide e seu estágio clínico, observaram que há associação positiva da obesidade e tamanho tumoral maior que 2,0 cm e estágios mais avançados (III ou IV).

Não há referências sobre o perfil de marcação de imunofluorescência da leptina e seu receptor em carcinomas papilíferos de tireoide em população de crianças e adolescentes, sendo este o foco desta tese.

Pretendemos elucidar se a expressão das proteínas da via de sinalização da leptina podem guardar alguma relação com características clínico-patológicas do carcinoma papilífero de tireoide em crianças e adolescentes. O questionamento se faz nesse momento visto que há relatos de que esse hormônio apresenta ações mitogênicas e angiogênicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a associação entre o carcinoma papilífero de tireoide em crianças e adolescentes e a via de sinalização da leptina, através da análise das proteínas ObR, pJAK2 e pSTAT3, relacionando com a progressão da doença.

2.2 Específicos

- a) Verificar a aplicabilidade da imunofluorescência para os anticorpos ObR, pJAK2 e pSTAT3 em lâminas provenientes de recortes de blocos de parafina de carcinomas papilíferos de tireoide (tumores primários) acometendo crianças e adolescentes (até 19 anos completos) para identificar tais proteínas da via de sinalização da leptina;
- b) Comparar a marcação de imunofluorescência de áreas tumorais com tecido tireoidiano normal adjacente;
- c) Relacionar os dados de marcação de imunofluorescência (extensão e padrão de marcação) com as características clínico-patológicas dos pacientes e do tumor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo em que foram incluídos 52 pacientes de 4 anos até 19 anos completos com diagnóstico de carcinoma papilífero da tireoide, operados ou encaminhados para o INCA para tratamento complementar, que tinham disponíveis, no arquivo da Divisão de Patologia, blocos de parafina que representem o tumor e o tecido tireoidiano adjacente, de julho de 1997 a dezembro de 2008.

Os dados clínico-patológicos (tamanho do tumor, lateralidade, multicentricidade, invasão de cápsula, extensão extratireoidiana, metástase linfonodal e à distância) além de peso e altura para cálculo de Índice de Massa Corporal (IMC) foram obtidos a partir dos formulários médicos enviados à Anatomia Patológica ou em revisão de prontuários.

Os blocos foram recortados de forma aleatória, com 5 μ m para confecção de lâminas histológicas que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e/ou processadas para estudo de imunofluorescência. As lâminas coradas pelo HE foram utilizadas para revisão diagnóstica e confirmação de carcinoma papilífero, além do subtipo do tumor, realizados pelo mesmo patologista (Araujo Jr, MLC). Os subtipos histológicos de carcinoma papilífero foram classificados de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004). Observamos características histopatológicas que influenciam o estadiamento patológico, como infiltração de cápsula, invasão de vasos, extensão para tecidos moles extratireoidianos, além de se observar a presença de tecido tireoidiano não-neoplásico adjacente.

O estudo está registrado pelo CEP/INCA número 58/11 CAAE 0029.0.007.000-11, aprovado em conjunto com os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em 26 de julho de 2011.

A técnica de imunofluorescência foi realizada no Laboratório de Fisiologia Endócrina da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Para realizar a marcação por imunofluorescência, inicialmente, as lâminas foram colocadas em estufa à 60°C e passadas por banhos de xilol para a desparafinização e em seguida, foram reidratadas com banhos de álcool etílico em concentrações decrescentes.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas 6 vezes em PBS + Triton 0,3% (salina tamponada com fosfato: KCl 2,7mM; KH₂PO₄ 1,47mM; NaCl 136mM e Na₂HPO₄ 8mM; pH 7,4). Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS a 5% por 1 hora em temperatura ambiente para bloqueio de ligações inespecíficas. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS-BSA 1% por 2 horas em temperatura ambiente e durante a noite a 4°C. Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS e então incubadas com os anticorpos secundários apropriados diluídos em PBS-BSA 1% por 2 horas em temperatura ambiente e mantidas no escuro. Após lavagens, as lâminas foram contra-coradas com o marcador de núcleo DAPI (Sigma, diluição 1:1000 em água destilada) por 2 minutos. Segue-se com lavagens com PBS e após, com água destilada. As lâminas foram montadas em meio de montagem Pro-long Gold Antifade (Molecular Probes, Invitrogen) e guardadas a -20°C protegidas da luz.

Foram realizadas reações de imunofluorescência para receptor de leptina (ObR) e proteínas de sua via de sinalização pJAK2 e pSTAT3 (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Características dos anticorpos primários utilizados no estudo

<i>Anticorpo anti-</i>	<i>Marca</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Origem</i>	<i>Diluição</i>
ObR	Santa Cruz	Monoclonal IgG	camundongo	1:100
pSTAT-3	Santa Cruz	Monoclonal IgG	camundongo	1:100
pJAK-2	Santa Cruz	Monoclonal IgG	coelho	1:100

Fonte: Younes-Rapozo et al, 2014.

Tabela 3 – Características dos anticorpos secundários utilizados no estudo

<i>Anticorpo anti-</i>	<i>Conjugado a</i>	<i>Marca</i>	<i>Origem</i>	<i>Diluição</i>
IgG de coelho	Alexa Fluor 488	M.Probes, Invitrogen	Burro	1:400
IgG de camundongo	Alexa Fluor 555	M.Probes, Invitrogen	Burro	1:400

Fonte: Younes-Rapozo et al, 2014.

As análises e aquisição das imagens foram obtidas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51, Tokyo, Japan), acoplado à câmera digital (Olympus DP72), com aumento de 40X.

A expressão e o padrão dos marcadores foram avaliados semiquantitativamente por consenso entre dois patologistas (Mario Lucio Cordeiro Araujo Junior e Carlos Frederico Ferreira Campos). O escore foi dado baseado na extensão (1-10%, 11-33%, 34-66% e >66%) da marcação, além de serem observados possíveis padrões de marcação (dot, em rede, contínua, puntiforme, dentre outros). Os patologistas desconheciam os demais achados clínicos e histopatológicos referentes aos pacientes ao realizarem a leitura das lâminas.

Análise Estatística

Para avaliar possíveis associações entre as faixas de ObR (agrupando os níveis em 1-10% e >10%) e as variáveis qualitativas demográficas (sexo, faixa etária, IMC categorizado) e clínicas (invasão capsular, invasão vascular, extensão extratireoidiana, variantes histológicas, metástase linfonodal, multicentricidade, metástase à distância) foram utilizadas, em caráter exploratório, tabelas de contingências e testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade) e testes exatos de Fisher, quando fosse apropriado. Para avaliar diferenças nas faixas de ObR para as variáveis quantitativas demográficas (idade e IMC) e clínicas (tamanho do tumor) foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As mesmas análises foram

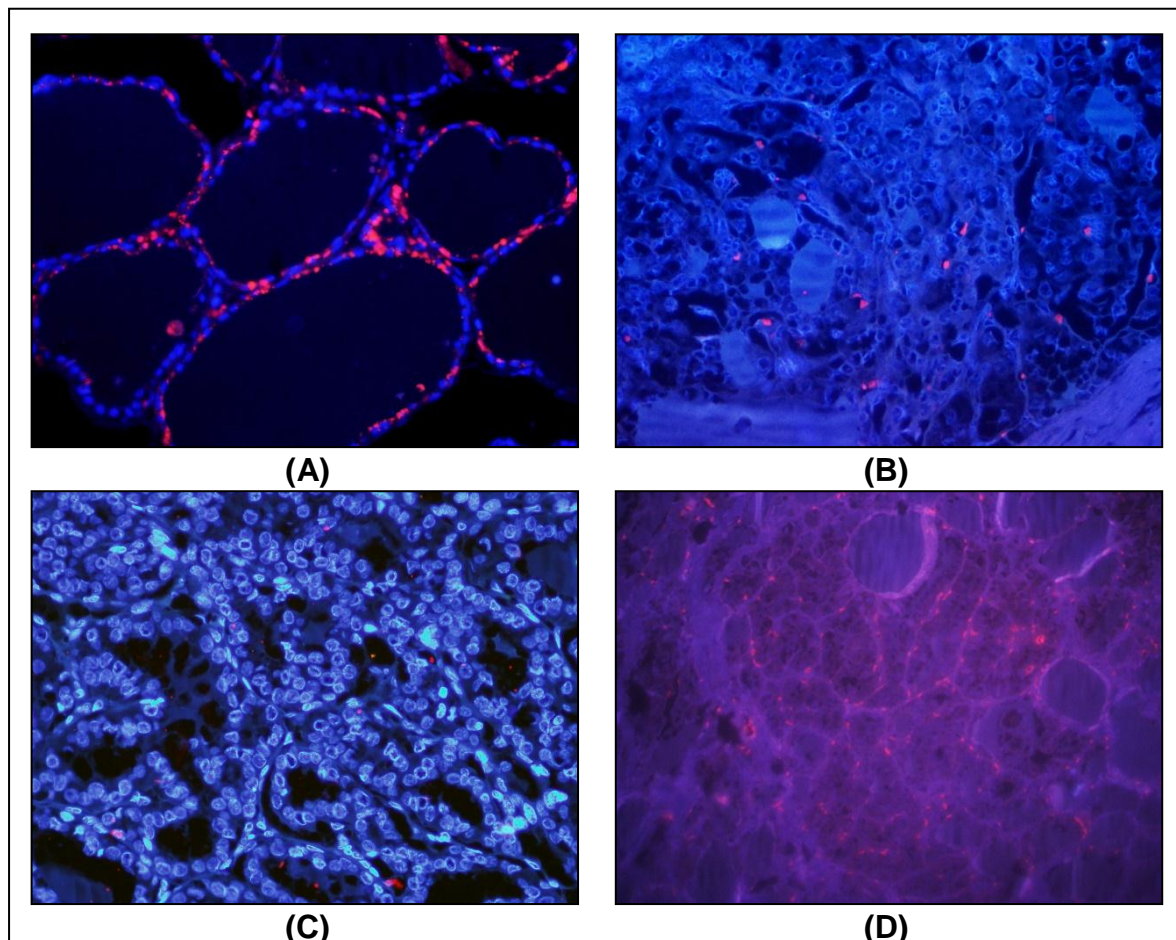
realizadas para avaliar associações com as variáveis pSTAT3 e pJAK2. Foi definido nível de significância $\alpha=0.05$.

Para avaliar possíveis associações entre as faixas de ObR (agrupando os níveis em 1-10% e >10%) e as variáveis qualitativas demográficas e clínicas supracitadas, em um contexto multivariado, foram utilizados Modelos Lineares Generalizados assumindo distribuição de Bernoulli e função de ligação logística. As variáveis que apresentaram P-valor<0.20 na análise univariada foram inseridas no modelo multivariado e mantidas apenas as que apresentaram P-valor ≤ 0.05 .

4 RESULTADOS

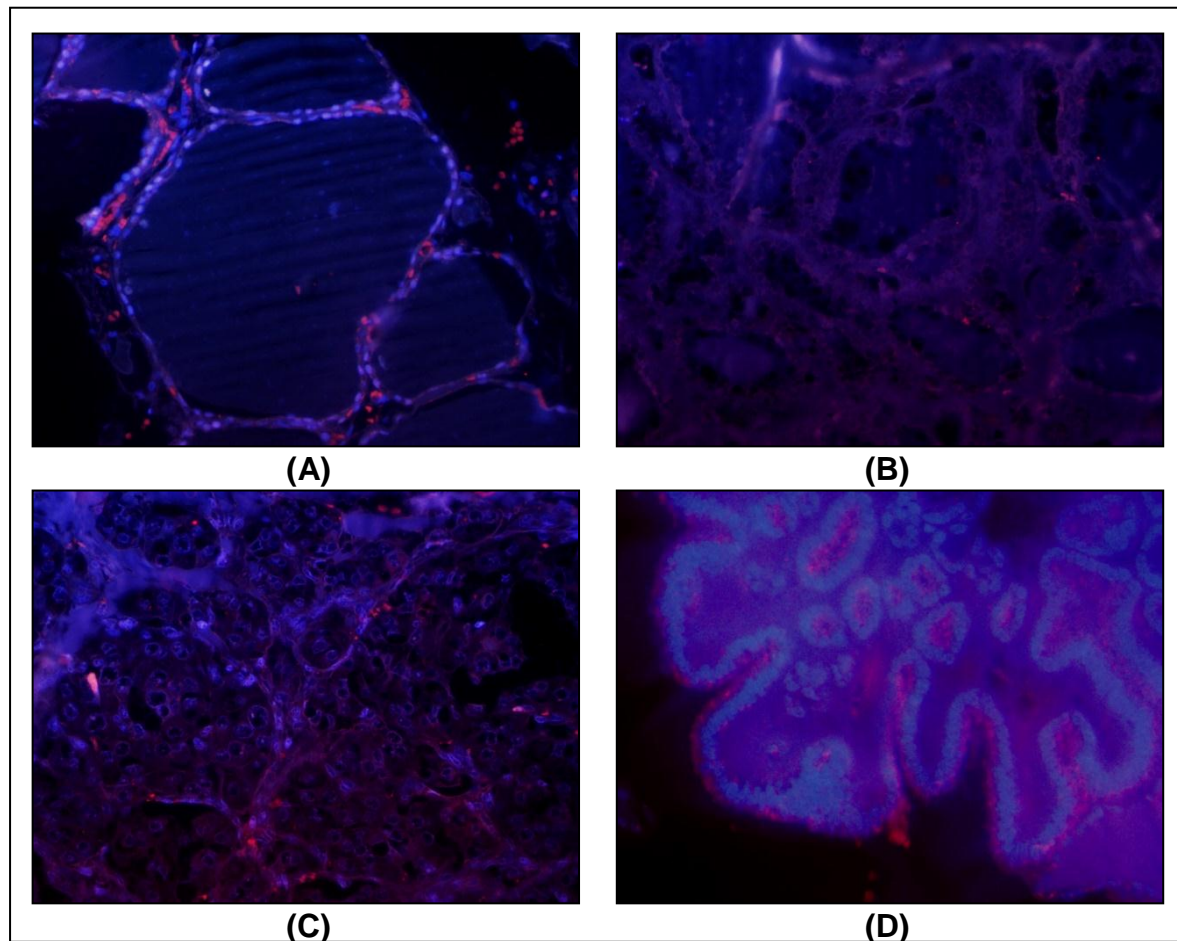
A marcação para ObR, pJAK2 e pSTAT3 foi puntiforme e multifocal no tecido tireoidiano adjacente ao tecido tumoral nos 52 casos analisados no estudo, e tiveram o mesmo perfil de marcação por imunofluorescência no tecido tumoral. Em todos os casos de tecido paranodular analisado a marcação para ObR, pJAK2 e pSTAT3 foi maior que 10% (Figuras 6, 7 e 8).

Figura 6 – Perfil de marcação para ObR no tecido tireoidiano normal e neoplásico



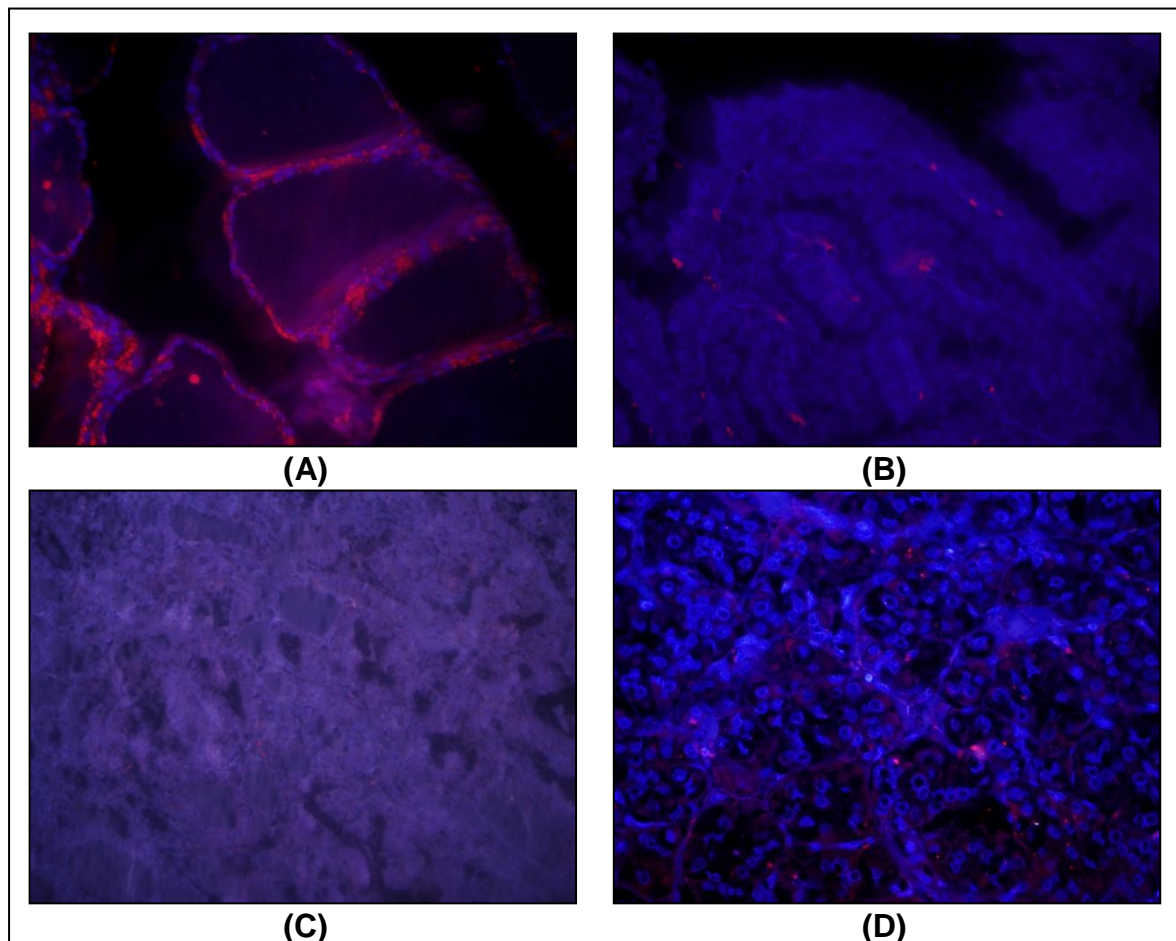
Legenda: (A) a (D) - (A) ObR Tecido tireoidiano não neoplásico. (B) ObR, paciente 48, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcção positiva em 11-33% das células neoplásicas. (C) ObR, paciente 19, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcção positiva em 34-66% das células neoplásicas. (D) ObR, paciente 36, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcção positiva em mais de 66% das células neoplásicas.

Figura 7 – Perfil de marcação para pJAK2 no tecido tireoidiano normal e neoplásico



Legenda: (A) a (D) - (A) JAK2 Tecido tireoidiano não neoplásico. (B) JAK2, paciente 47, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcacão positiva em 11-33% das células neoplásicas. (C) JAK2, paciente 48, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcacão positiva em 34-66% das células neoplásicas. (D) JAK2, paciente 50, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcacão positiva em mais de 66% das células neoplásicas.

Figura 8 – Perfil de marcação para pSTAT3 no tecido tireoidiano normal e neoplásico



Legenda: (A) a (D) - (A) pSTAT3 Tecido tireoidiano não neoplásico. (B) pSTAT3, paciente 51, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcacão positiva em 1-10% das células neoplásicas. (C) pSTAT3, paciente 36, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcacão positiva em 11-33% das células neoplásicas. (D) pSTAT3, paciente 48, perfil de marcação puntiforme, multifocal, imunomarcacão em 34-66% das células neoplásicas, com fundo em rede.

As frequências absolutas e relativas de faixas de positividade no tecido tumoral para ObR, pJAK2 e pSTAT3 são descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Frequências absolutas e relativas de ObR, pSTAT3, pJAK2

Variáveis	N (%)	N
ObR:		51
1-10%	24 (47,1%)	
11-33%	20 (39,2%)	
34-66%	5 (9,80%)	
>66%	2 (3,92%)	
pJAK2:		51
1-10%	27 (52,9%)	
11-33%	16 (31,4%)	
34-66%	7 (13,7%)	
>66%	1 (1,96%)	
pSTAT3:		51
1-10%	15 (29,4%)	
11-33%	24 (47,1%)	
34-66%	9 (17,6%)	
>66%	3 (5,88%)	

Com base na Tabela 4, verificamos que tanto o ObR, quanto o pJAK2 e o pSTAT3 apresentaram frequências baixas para os níveis 34-66% e >66% indicando que estes deveriam ser agregados para serem atendidos os pressupostos dos testes de associação a serem realizados, sendo considerados como relevantes os testes que apresentaram positividade em mais de 10% da área tumoral.

As frequências absolutas e relativas de ObR, pJAK2 e pSTAT3 nas faixas 1-10% e >10%, e as variáveis idade, sexo, tamanho do tumor, invasão capsular, invasão vascular, extensão extratireoidiana, metástase linfonodal, multicentricidade, metástase à distância, faixa etária e IMC são descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Frequências absolutas e relativas de ObR, pSTAT3, pJAK2 e demais variáveis demográficas e clínicas dos pacientes (continua).

Variáveis	N (%)	N
ObR:		51
1-10%	24 (47,1%)	
>10%	27 (52,9%)	
pJAK2:		51
1-10%	27 (52,9%)	
>10%	24 (47,1%)	

Tabela 5 – Frequências absolutas e relativas de ObR, pSTAT3, pJAK2 e demais variáveis demográficas e clínicas dos pacientes (conclusão).

Variáveis	N (%)	N
pSTAT3:		51
1-10%	15 (29,4%)	
>10%	36 (70,6%)	
Idade ^a	13,6 (3,53)	52
Sexo		52
Feminino	36 (69,2%)	
Masculino	16 (30,8%)	
IMC ^a	20.4 (3,56)	45
Tamanho do tumor ^a	2.51 (1,46)	49
Invasão capsular		51
Não	15 (29,4%)	
Sim	36 (70,6%)	
Invasão vascular		49
Não	27 (55,1%)	
Sim	22 (44,9%)	
Atinge partes moles		50
Não	18 (36,0%)	
Sim	32 (64,0%)	
Morfologia		52
Clássico	34 (65,4%)	
Esclerosante	1 (1,92%)	
Sólido	4 (7,69%)	
Variante folicular	13 (25,0%)	
Metástase linfonodal		49
Não	13 (26,5%)	
Sim	36 (73,5%)	
Multicentricidade		51
Não	22 (43,1%)	
Sim	29 (56,9%)	
Metástase à distância		52
Não	46 (88,5%)	
Sim	6 (11,5%)	
Faixa etária		52
4 -11	12 (23,1%)	
12 -20	40 (76,9%)	
IMC categorizado		45
Magreza	16 (35,6%)	
Saudavel	25 (55,6%)	
Sobrepeso	4 (8,89%)	

Nota: ^a Descrição de média e desvio padrão

Observa-se na Tabela 5 que 27 pacientes (52,9%) tiveram marcação por imunofluorescência em mais de 10% da área tumoral para ObR, 24 pacientes (47,1%) para pJAK2 e 36 pacientes (70,6%) para pSTAT3.

A média de idade dos pacientes do estudo foi de 13,6 anos, sendo, como esperado, a maioria dos pacientes do sexo feminino (36 pacientes do sexo feminino (69,2%) e 16 do sexo masculino (30,8%)).

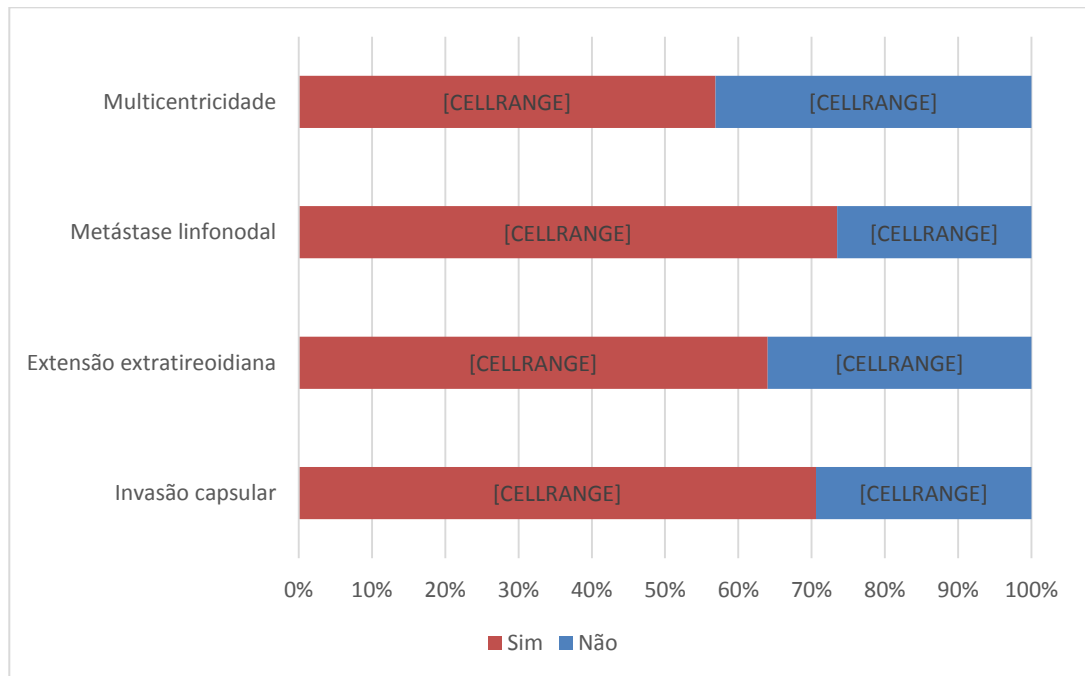
A média do tamanho tumoral foi de 2,51cm, e 34 (65,4%) pacientes apresentaram morfologia de variante clássica do carcinoma papilífero, seguido por 13 (25,0%) pacientes com a variante folicular e 4 (7,69%) apresentaram-se com a variante sólida.

Quanto ao IMC, 16 (35,6%) pacientes estavam na categoria de magros, 25 (55,6%) na categoria eutrófico e, apenas 4 (8,89%) na categoria de sobrepeso. Nenhum paciente encontrou-se nas categorias de obesidade.

Ainda com base na Tabela 5 verificamos alta proporção de alguns achados clínicos e/ou histopatológicos que indicam agressividade da doença e estas foram destacadas no gráfico da Figura 9.

A Tabela 6 apresenta as frequências absolutas e relativas (por linha) de cada variável demográfica e clínica por faixa de ObR (1-10% e >10%), e o respectivo P-valor para o teste de associação mais adequado para cada caso (Qui-quadrado [com e sem correção de continuidade], Exato de Fisher, e Mann-Whitney).

Figura 9 – Proporções de características histopatológicas indicadoras de agressividade de doença nos pacientes do estudo



Com base na Tabela 6 verificamos que para o nível de significância $\alpha=0.05$ apenas as variáveis sexo e IMC categorizado foram significativas. Para o sexo, os pacientes do sexo masculino apresentaram maior proporção de ObR >10% em relação as pacientes do sexo feminino (81.2% e 40%, respectivamente) e os pacientes que apresentaram IMC indicando magreza apresentaram maior percentual de indivíduos com ObR >10% (80%).

Tabela 6 – Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de ObR (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado

Variáveis	ObR		P-valor (overall)
	1-10% N=24	>10% N=27	
Sexo			0.015
Feminino	21(60%)	14(40%)	
Masculino	3(18.8%)	13(81.2%)	
Invasão capsular			0.804
Não	6(40%)	9(60%)	
Sim	17(48.6%)	18(51.4%)	
Invasão vascular			0.855
Não	11(40.7%)	16(59.3%)	
Sim	10(47.6%)	11(52.4%)	
Extensão extratireoidiana			0.346
Não	6(33.3%)	12(66.7%)	
Sim	16(51.6%)	15(48.4%)	
Morfologia			0.223
Clássico	13(39.4%)	20(60.6%)	
Esclerosante	0(0%)	1(100%)	
Sólido	2(50%)	2(50%)	
Variante folicular	9(69.2%)	4(30.8%)	
Metástase linfonodal			0.181
Não	3(25%)	9(75%)	
Sim	19(52.8%)	17(47.2%)	
Multicentricidade			0.214
Não	7(33.3%)	14(66.7%)	
Sim	16(55.2%)	13(44.8%)	
Metástase à distância			0.354
Não	23(50%)	23(50%)	
Sim	1(20%)	4(80%)	
Faixa etária			0.573
4 -11	7(58.3%)	5(41.7%)	
12 -20	17(43.6%)	22(56.4%)	
IMC categorizado			0.006
Magreza	3(20%)	12(80%)	
Saudável	13(52%)	12(48%)	
Sobrepeso	4(100%)	0(0%)	
Tamanho do tumor ^a	2.68 (1.52)	2.23 (1.26)	0.279

A Tabela 7 apresenta as frequências absolutas e relativas (por linha) de cada variável demográfica e clínica por faixa de pJAK2 (1-10% e >10%), e o respectivo P-valor para o teste de associação mais adequado para cada caso (Qui-quadrado [com e sem correção de continuidade], Exato de Fisher, e Mann-Whitney).

Tabela 7 – Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de pJAK2 (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado (continua)

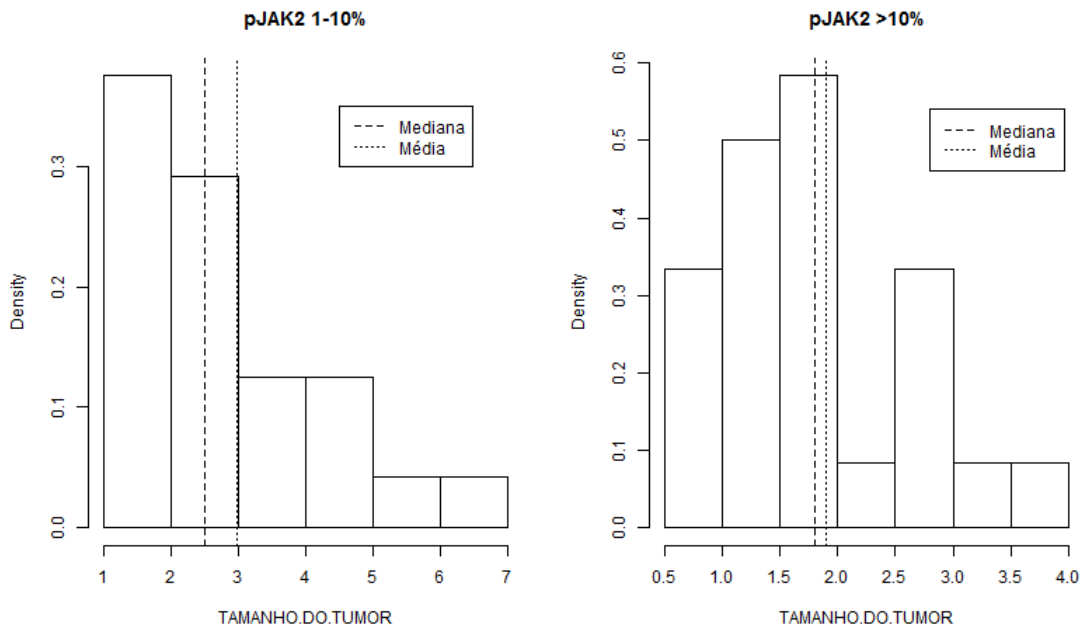
Variáveis	pJAK2		P-valor (overall)
	1-10% N=27	>10% N=24	
Sexo			0.557
Feminino	20(57.1%)	15(42.9%)	
Masculino	7(43.8%)	9(56.2%)	
Invasão capsular			0.155
Não	5(33.3%)	10(66.7%)	
Sim	21(60%)	14(40%)	
Invasão vascular			0.561
Não	12(44.4%)	15(55.6%)	
Sim	12(57.1%)	9(42.9%)	
Extensão extratireoidiana			0.223
Não	7(38.9%)	11(61.1%)	
Sim	19(61.3%)	12(38.7%)	
Morfologia			0.374
Clássico	16(48.5%)	17(51.5%)	
Esclerosante	0(0%)	1(100%)	
Sólido	2(50%)	2(50%)	
Variante folicular	9(69.2%)	4(30.8%)	
Metástase linfonodal			0.243
Não	4(33.3%)	8(66.7%)	
Sim	21(58.3%)	15(41.7%)	
Multicentricidade			0.81
Não	10(47.6%)	11(52.4%)	
Sim	16(55.2%)	13(44.8%)	
Metástase à distância			0.656
Não	25(54.3%)	21(45.7%)	
Sim	2(40%)	3(60%)	

Tabela 7 – Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de pJAK2 (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado (conclusão)

Variáveis	pJAK2		P-valor (overall)
	1-10% N=27	>10% N=24	
Faixa etária			0.448
4 -11	8(66.7%)	4(33.3%)	
12 -20	19(48.7%)	20(51.3%)	
IMC categorizado			0.202
Magreza	7(46.7%)	8(53.3%)	
Saudável	13(52%)	12(48%)	
Sobrepeso	4(100%)	0(0%)	
Tamanho do tumor ^a	2.98 (1.59)	1.90 (0.89)	0.006

Com base na Tabela 7 verificamos que, para o nível de significância $\alpha=0.05$, foi significativa apenas a variável tamanho tumoral (P-valor=0.006); a média do tamanho tumoral dos pacientes com pJAK2 >10% foi menor do que a média do tamanho tumoral para os pacientes com pJAK2 1-10% (1.90 e 2.98 respectivamente). Observando a Figura 10 com os histogramas do tamanho tumoral por faixa de pJAK2, verificamos que as distribuições dos tamanhos tumorais em ambos os grupos foram assimétricas à direita, no entanto, existem diferenças tanto na centralidade quanto na variabilidade das distribuições para cada faixa, indicando diferença entre as distribuições do tamanho tumoral.

Figura 10 – Histograma do tamanho do tumor para os diferentes níveis de pJAK2 (1-10% e >10)



Legenda: A centralidade do tamanho tumoral entre os casos negativos para pJAK2 encontra-se entre 2 e 3 cm, enquanto que, nos casos positivos, está entre 1,5 e 2 cm. A variabilidade do tamanho tumoral nos casos negativos é de 1 a 7 cm, e é menor entre os casos positivos, que variam de 0,5 a 4 cm.

A Tabela 8 apresenta as frequências absolutas e relativas (por linha) de cada variável demográfica e clínica por faixa de pSTAT3 (1-10% e >10%), e o respectivo P-valor para o teste de associação mais adequado para cada caso (Qui-quadrado [com e sem correção de continuidade], Exato de Fisher, e Mann-Whitney).

Tabela 8 – Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de pJAK2 (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado (continua)

Variáveis	pSTAT3		P-valor (overall)
	1-10% N=15	>10% N=36	
Sexo			0.51
Feminino	9(25.7%)	26(74.3%)	
Masculino	6(37.5%)	10(62.5%)	
Invasão capsular			0.507
Não	3(20%)	12(80%)	
Sim	11(31.4%)	24(68.6%)	

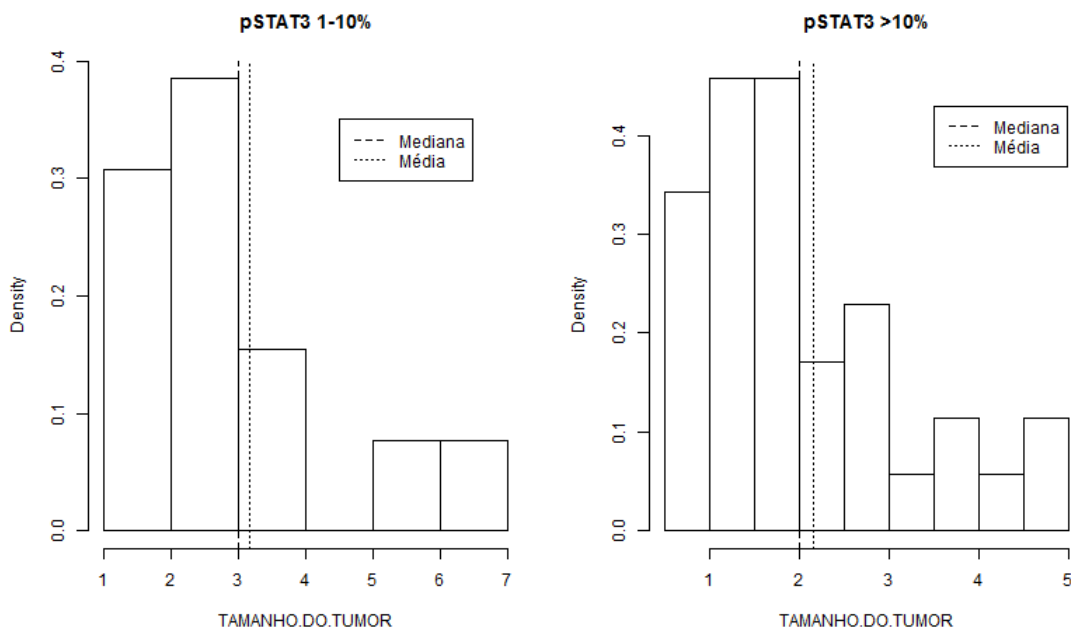
Tabela 8 – Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas e clínicas para cada faixa de pJAK2 (1-10% e >10%), e P-valores para os testes Qui-quadrado (com e sem correção de continuidade), Exato de Fisher, e Mann-Whitney, conforme apropriado (conclusão)

Variáveis	pSTAT3		P-valor (overall)
	1-10% N=15	>10% N=36	
Invasão vascular			1
Não	7(25.9%)	20(74.1%)	
Sim	6(28.6%)	15(71.4%)	
Extensão extratireoidiana			0.743
Não	4(22.2%)	14(77.8%)	
Sim	9(29%)	22(71%)	
Morfologia			0.684
Clássico	11(33.3%)	22(66.7%)	
Esclerosante	0(0%)	1(100%)	
Sólido	0(0%)	4(100%)	
Variante folicular	4(30.8%)	9(69.2%)	
Metástase linfonodal			0.726
Não	4(33.3%)	8(66.7%)	
Sim	10(27.8%)	26(72.2%)	
Multicentricidade			0.808
Não	5(23.8%)	16(76.2%)	
Sim	9(31%)	20(69%)	
Metástase à distância			1
Não	14(30.4%)	32(69.6%)	
Sim	1(20%)	4(80%)	
Faixa etária			0.73
0 -12	4(33.3%)	8(66.7%)	
12 -20	11(28.2%)	28(71.8%)	
IMC categorizado			0.681
Magreza	4(26.7%)	11(73.3%)	
Saudável	8(32%)	17(68%)	
Sobrepeso	0(0%)	4(100%)	
Tamanho do tumor ^a	3.17 (1.67)	2.16 (1.18)	0.063

Com base na Tabela 8 verificamos que para o nível de significância $\alpha=0.05$ nenhuma variável foi significativa, no entanto como *borderline* foi identificada a variável tamanho tumoral (P-valor=0.063); a média do tamanho tumoral dos

pacientes com pSTAT3 >10% foi sutilmente menor do que a média do tamanho para os pacientes com pSTAT3 1-10% (2.16 e 3.17, respectivamente). Observando a Figura 11 com os histogramas do tamanho tumoral por faixa de pSTAT3, verificamos que as distribuições dos tamanhos tumorais em ambos os grupos foram assimétricas à direita, no entanto, existem diferenças tanto na centralidade quanto na variabilidade das distribuições para cada faixa, indicando diferença entre as distribuições do tamanho tumoral.

Figura 11 – Histograma do tamanho do tumor para os diferentes níveis de pSTAT3 (1-10% e >10)



Legenda: A centralidade do tamanho tumoral entre os casos negativos para pSTAT3 encontra-se próxima de 3 cm, enquanto que, nos casos positivos, está próxima de 2 cm. A variabilidade do tamanho tumoral nos casos negativos é de 1 a 7 cm, e é menor entre os casos positivos, que variam de 1 a 5 cm.

Modelos multivariados

A Tabela 9 apresenta as razões de chances para o evento “ter ObR maior do que 10%”, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas (para $\alpha=0.05$) no modelo multivariado.

Tabela 9 – Razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas no Modelo Linear Generalizado multivariado com desfecho ObR (1-10% e >10%)

Variáveis	ObR	
	Multivariada OR(IC95%)	P-valor
Sexo		
Feminino	1	
Masculino	14.31 (2.77-126.34)	<0.01
Morfologia		
Clássico	1	
Esclerosante	-	-
Sólido	0.33 (0.01-5.35)	0.46
Variante folicular	0.1 (0.01-0.67)	0.03
Metástase linfonodal		
Não	1	
Sim	0.16 (0.02-0.83)	0.04

Com base na Tabela 9, verificamos que a chance de ter ObR >10% para pacientes do sexo masculino é 14.31 vezes (IC95%:[2.77-126.34]; P-valor<0.01) a chance referente a pacientes do sexo feminino, controlada pelas demais variáveis. A chance de ter ObR >10% para pacientes com morfologia clássica é 10 vezes¹ (IC95%:[1.49-100]; P-valor=0.03) a chance referente a pacientes com morfologia variante folicular, controlada pelas demais variáveis. Pacientes sem metástase linfonodal apresentaram chance de ter ObR >10% 6.25 vezes² (IC95%:[1.20-50]; P-valor=0.04) a chance referente aos pacientes com metástase linfonodal, controlada pelas demais variáveis.

A Tabela 10 apresenta as razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas (para $\alpha=0.05$) no modelo multivariado com desfecho pJAK2.

¹ Esta razão de chances é o inverso da razão de chances para morfologia variante folicular da Tabela 9 ($1/0.1=10$).

² Esta razão de chances é o inverso da razão de chances para a metástase linfonodal da Tabela 9 ($1/0.16=6.25$).

Tabela 10 – Razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas no Modelo Linear Generalizado multivariado com desfecho pJAK2 (1-10% e >10%)

pJAK2		
Variáveis	Multivariada	
	OR(IC95%)	P-valor
Tamanho do tumor	0.47 (0.24-0.8)	0.01

Com base na Tabela 10, verificamos que apenas o tamanho do tumor apresentou associação significativa com pJAK2 no modelo multivariado, em que, para cada centímetro a mais no tamanho do tumor a chance de apresentar pJAK2 maior do que 10% é 53% menor (IC95%:[20%-76%]; P-valor=0.01).

A Tabela 11 apresenta as razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas (para $\alpha=0.05$) no modelo multivariado com desfecho pSTAT3.

Tabela 11 – Razões de chances, intervalos de confiança de 95% e P-valores para as variáveis significativas no Modelo Linear Generalizado multivariado com desfecho pSTAT3 (1-10% e >10%)

pSTAT3		
Variáveis	Multivariada	
	OR(IC95%)	P-valor
Tamanho do tumor	0.6 (0.35-0.95)	0.04

Com base na Tabela 11, verificamos que apenas o tamanho do tumor apresentou associação significativa com pSTAT3 no modelo multivariado, em que, para cada centímetro a mais no tamanho do tumor a chance de apresentar pSTAT3 >10% é 40% menor (IC95%:[5%-65%]; P-valor=0.04).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, descrevemos pela primeira vez o perfil de marcação para três proteínas da via de sinalização da leptina (ObR, pJAK2 e pSTAT3) em carcinomas papilíferos de tireoide de crianças e adolescentes, correlacionando com características clínicas e patológicas.

A população pediátrica tem uma apresentação clínica distinta do carcinoma de tireoide quando comparada à de adultos, geralmente mais agressiva, como demonstramos neste estudo, em que quase um terço dos tumores possuíam mais de 3,0 cm, quase dois terços dos pacientes apresentavam metástase linfonodal, mais da metade eram tumores multicêntricos e 11% apresentavam metástase à distância para pulmão. Em uma revisão sistemática da literatura, Vaisman *et al.* (2011) avaliaram a apresentação clínica do carcinoma de tireoide em crianças e adolescentes, demonstrando que o tamanho do tumor é maior em pacientes com menos de 20 anos de idade. Em outro estudo, 36% das crianças apresentavam tumores diagnosticados maiores do que 4,0 cm (Zimmerman *et al.* 1988). Metástase para linfonodos cervicais (90%) e à distância (7%) também são mais frequentes na população pediátrica, como observado em uma série da Mayo Clinic com 1039 pacientes com carcinoma papilífero de tireoide. Assim, nossos achados estão de acordo com a literatura mundial. Em nosso estudo, todas as metástases à distância foram para pulmão, corroborando com publicações prévias. Em outras séries, raros casos de metástase à distância para osso (Newman *et al.* 1998) e para sistema nervoso central (Hay, 1987) foram publicados.

Apesar de crianças e adolescentes apresentarem doença agressiva, o prognóstico é geralmente bom. Dinauer & Francis (2007) afirmam que o tumor tireoidiano induz uma resposta imune robusta nas crianças podendo contribuir para maior longevidade dessa população.

Hedayati *et al.* (2011) mostraram que na população adulta a leptina sérica dosada em grupo com câncer de tireoide foi significativamente maior que no grupo controle, sugerindo uma associação entre hiperleptinemia e carcinoma papilífero de tireoide, corroborando com publicação prévia de Akinci *et al.* (2009). Numa visão simplista, esse fato poderia sugerir que a hiperleptinemia aumenta o risco de carcinoma papilífero de tireoide. Entretanto, o fato dos níveis de leptina diminuírem

após tireoidectomia total sugere que o carcinoma papilífero pode contribuir para hiperleptinemia (Akinci *et al.* 2009). Com isso, parece que a relação entre carcinoma de tireoide e leptina é mais complexa do que mera relação de causa/efeito.

Em nosso estudo, a marcação pela imunofluorescência para ObR, pJAK2 e pSTAT3 foi positiva em mais de 10% do tecido tireoidiano adjacente, não-neoplásico em todos os 52 casos. Ao contrário, a expressão dessas proteínas no tecido neoplásico foi menos prevalente, em que quase metade dos pacientes tiveram marcação menor que 10% para ObR e pJAK2 e 1/3 para pSTAT3. Assim, nosso estudo sugere que pode haver relação entre o grau de diferenciação do carcinoma papilífero de tireoide e a expressão de proteínas da via de sinalização da leptina, sendo talvez a pSTAT3 a que guarde mais relação.

Cheng *et al.* (2010) detectaram positividade para ObR em 25 de 49 (51%) casos de carcinoma papilífero de tireoide, semelhante aos nossos resultados, mas não exclusivamente em população de crianças e adolescentes. Curiosamente, não observaram imunoreatividade para ObR no tecido tireoidiano adjacente não-neoplásico, enquanto nós observamos em todos os casos do estudo. Uddin *et al.* encontraram positividade para ObR em 80% de 532 pacientes com carcinoma papilífero e em 37% do tecido tireoidiano adjacente. Zhang *et al.* (2013) observaram positividade para ObR em 56 de 76 (73.9%) pacientes com carcinoma papilífero, em uma população geral, porém não mencionam o perfil de marcação do tecido tireoidiano adjacente. Nós sugerimos que a expressão do ObR na tireoide normal pode decrescer com a idade, enquanto que nos tumores pode haver um aumento com a idade. Além disso, uma das diferenças na metodologia usada no nosso estudo e nos estudos citados é a técnica de imunofluorescência ao invés da imunohistoquímica com revelação por peroxidase. Nós optamos pela imunofluorescência pois não requer a etapa de inativação da peroxidase endógena, que está presente em alta concentração no tecido pela presença da tireoperoxidase (TPO). É possível, que nos estudos anteriores, se tenha falhado de obter marcação para ObR devido a não se conseguir efetivamente neutralizar a TPO no tecido adjacente, enquanto que no tecido tumoral, geralmente a expressão da TPO está diminuída.

Nossos achados mostram associação da positividade para ObR com o sexo masculino, o IMC e com a variante clássica do carcinoma papilífero. Entretanto, a associação com IMC desaparece na análise multivariada, sugerindo que outros

fatores do tumor associados a magreza é que influenciaram esta associação. Infelizmente, não fizemos as associações entre sexo ou IMC e progressão da doença, visto que não era objetivo do presente estudo. Desta forma, qualquer explicação a respeito da ausência de associação direta entre sexo ou IMC com a positividade para ObR seria meramente especulativa.

Observamos ainda que a positividade para ObR é menor em pacientes com metástase linfonodal, indicando que a resistência à leptina pode participar na patogênese e agressividade da apresentação clínico-patológica de crianças e adolescentes. Nossos dados não verificaram associação entre a positividade para ObR com o tamanho tumoral, porém estudos anteriormente publicados apontam para associação tanto com tamanho tumoral e metástase linfonodal (Cheng *et al.* 2010) ou apenas com tamanho tumoral (Zhang *et al.* 2013). Nós estudamos uma população jovem (idade variando de 4 a 20 anos) e de etnias variadas, enquanto esses estudos foram realizados com população predominantemente chinesa, sem mencionar a idade dos pacientes do estudo. É possível que a idade seja um fator importante para o efeito da leptina na regulação do tamanho tumoral e agressividade. Corroborando nossos achados, Isozaki *et al.* (2004) em uma linhagem de células tireoidianas FRTL-5 mostraram que a leptina inibe a síntese de DNA, sugerindo um efeito anti-proliferativo da leptina.

Nosso estudo demonstra que a ausência de marcação relevante por imunofluorescência para pJAK2 e pSTAT3 está associada com tumores maiores. Não foi identificada na literatura qualquer publicação relacionando pJAK2 com carcinoma papilífero de tireoide. Em relação a pSTAT3, há relato de que sua atividade é negativamente relacionada com o tamanho tumoral de carcinomas papilíferos de tireoide, em amostra da população geral (Kim *et al.* 2012). Esse achado foi corroborado por Couto *et al.* (2012) que também demonstraram que o *knockout* de STAT3 aumenta a tumorigênese em linhagem de células de neoplasia de tireoide humana. Há relato na literatura de que a marcação para STAT3 exuberante em peças cirúrgicas de câncer colo-retal está associada com maior sobrevida (Gordziel *et al.*, 2013). Esses achados estão em acordo com nossos dados para pSTAT3 na população pediátrica. Porém, é possível que esta via seja ativada por outros fatores, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6, em outros tipos de câncer, podendo estar associada com pior prognóstico (von Manstein *et al.*, 2013; Judd *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014a). Por

exemplo, em câncer de mama, a ativação de JAK2/STAT3 via CXCL12-CXCR4 está relacionada com maior malignidade e metástase (Liu et al., 2014b).

Além da via JAK-STAT, a leptina pode também atuar pelas vias da MAPK e PI3K (Yang & Barouch, 2007). Alguns estudos relacionam a ativação de ERK/MAPK com mutações ou hiperexpressão de efetores do câncer de tireoide, incluindo o carcinoma papilífero (Fagin & Mitsiades, 2008; Knauf & Fagin, 2009). É possível que a sinalização da leptina ao ativar a via JAK-STAT no câncer de tireoide previna o crescimento do tumor e metástase. Por outro lado, se a leptina ativa ERK/MAPK, o prognóstico pode ser mais agressivo no carcinoma papilífero de tireoide. Uma das limitações de nosso estudo é que não avaliamos tais vias alternativas da sinalização da leptina.

Assim, a via de sinalização da leptina pode contribuir com fatores prognósticos positivos no carcinoma papilífero de crianças e adolescentes, visto que a expressão de ObR, pJAK2 e pSTAT3 está relacionada com dados que apontam para menor progressão tumoral nessa população. Apesar da obesidade não ter sido relacionada a doença neste nosso estudo, seu desenvolvimento na idade adulta com conseqüente resistência a leptina pode ser um fator de risco para maior progressão do carcinoma papilífero de tireoide, visto que as proteínas da via de sinalização da leptina são fatores inibitórios da progressão tumoral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) A imunofluorescência mostrou-se ser um método adequado para estudar as proteínas da via de sinalização da leptina (ObR, pJAK2 e pSTAT3), com marcação puntiforme e multifocal nos tecidos tireoidianos não-neoplásico e neoplásico;
- b) O carcinoma papilífero de tireoide em crianças e adolescentes apresenta-se de maneira agressiva. Nossa população apresentou metástase linfonodal em 73% e metástase para pulmão em 11% dos pacientes;
- c) Pacientes do sexo masculino são mais propensos a apresentar marcação relevante para o receptor de leptina, assim como pacientes sem metástase linfonodal;
- d) A marcação relevante para pJAK2 e pSTAT3 relaciona-se com menor tamanho tumoral;
- e) Nossos achados apontam para fatores prognósticos positivos do carcinoma papilífero de tireoide em crianças e adolescentes, sugerindo que a ativação da via de sinalização da leptina pode contribuir para prevenir o aumento da tumorigênese nessa população

REFERÊNCIAS

- Al-Brahim N; Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med*, 2006;130(7):1057-62.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:327-32.
- Akinci M, Kosova F, Cetin B, Aslan S, Ari Z, Cetin A. Leptin levels in thyroid cancer. *Asian J Surg*, 2009; 32(4):216-23.
- Aubin D, Gagnon A, Sorisky A. Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obes*, 2005; 29(8):1006-9.
- Bard D, Verger P, Hubert P. Chernobyl, 10 years after: health consequences. *Epidemiol Ver*, 1997;19(2):187-204.
- Bongiovanni M; Bloom L; Krane JF; Baloch ZW; Powers CN; Hintermann S; et al. Cytomorphologic features of poorly differentiated thyroid carcinoma: a multi-institutional analysis of 40 cases. *Cancer*, 2009; 117 (3):185-94.
- Cheng SP, Chi CW, Tzen CY, Yang TL, Lee JJ, Liu TP, et al. Clinicopathologic significance of leptin and leptin receptor expressions in papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 2010; 147(6): 847-53.
- Cheng SP, Yin PH, Hsu YC, Chang YC, Huang SY, Lee JJ, et al. Leptin enhances migration of human papillary thyroid cancer cells through the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Oncol Rep*. 2011; 26(5):1265-71.
- Cheng SP, Liu CL, Hsu YC, Chang YC, Huang SY, Lee JJ. Regulation of leptin receptor expression in human papillary thyroid cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2012; 66(6):469-73.
- Cinar N, Gurlek A. Association between novel adipocytokines adiponectin, vaspin, visfatin, and thyroid: an experimental and clinical update. *Endocr Connect* 2013; 2(4): R30-R38.
- Considine RV, Caro JF. Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 11: 1255-1272.
- Couto JP, Daly L, Almeida A, Knauf JA, Fagin JA, Sobrinho-Simões M, et al. STAT3 negatively regulates thyroid tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(35):E2361-70.
- Cristofano A. Obesity and Thyroid Cancer: Is Leptin the (Only) Link? *Endocrinology* 2013; 154(8): 2567-9.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006; 295(18):2164-7.

Dieringer P1, Klass EM, Caine B, Smith-Gagen J. Associations between body mass and papillary thyroid cancer stage and tumor size: a population-based study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 Aug 12. DOI 10.1007/s00432-014-1792-2

Dinauer C, Francis G L. Thyroid Cancer in Children. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2007; 36(3):779-806

Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 3.ed. Itapevi, SP : AC Farmacêutica, 2009.

Dottorini ME, Vignati A, Mazzucchelli L, Lomuscio G, Colombo L. Differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents: a 37-year experience in 85 patients. *J Nucl Med*,1997; 38(5):669-75.

Dutra SC, de Moura EG, Lisboa PC, Trevenzoli IH, Passos MC. Leptin-programmed rats respond to cold exposure changing hypothalamic leptin receptor and thyroid function differently from cold-exposed controls. *Regul Pept*. 2011;171(1-3): 58-64.

Dutra SC, Moura EG, Rodrigues AL, Lisboa PC, Bonomo I, Toste FP, et al. Cold exposure restores the decrease in leptin receptors (OB-Rb) caused by neonatal leptin treatment in 30-day-old rats. *J Endocrinol*. 2007; 195(2):351-8.

Endo T, Ohta K, Haraguchi K, Onaya T. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor cDNA from rat fat cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 10833-10837.

Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(3):784-91

Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2014. Acessado em 07 de novembro de 2014. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.

Fagin AJ & Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22(6): 955–969.

Faggiano A, Coulot J, Bellon N, Talbot M, Caillou B, Ricard M, et al. Age dependent variation of follicular size and expression of iodine transporters in human thyroid tissue. *Journal of Nuclear Medicine* 2004; 45:232–37.

Fain JN, Coronel EC, Beauchamp MJBS. Expression of leptin and b2-adrenergic receptors in rat adipose tissue in altered thyroid states. *Biochem J* 1997; 322: 145–150.

Feldt-Rasmussen U. Thyroid and Leptin. *Thyroid* 2007; 17(5):413-419.

- Flegal KM, Carrol MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *J Am Med Assoc* 2012; 307(5):491-497
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-9.
- Gale SM, Castracane D, Mantzoros CS. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr* 2004; 134(2): 295-298.
- Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 2006;207:12-22.
- Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, et al. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1447-53.
- Gordziel C, Bratsch J, Moriggl R, Knösel T, Friedrich K. Both STAT1 and STAT3 are favourable prognostic determinants in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 109(1):138-46.
- Harach HR & Williams ED. Childhood thyroid cancer in England and Wales. *British Journal of Cancer* 1995; 72:777-83.
- Harness JK, Thompson NW, McLeod MK, Pasiaka JL & Fukuuchi A. Differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents. *World Journal of Surgery* 1992; 16:547-53.
- Hay ID. Brain metastases from papillary thyroid carcinoma. *Arch Intern Med*. 1987; 147(3):607-611.
- Hedayati M, Yaghmaei P, Pooyamanesh Z, Yeganeh MZ, Rad LH. Leptin: A correlated peptide to papillary thyroid carcinoma? *J Thyroid Res*, 2011; 2011:832163
- Hogan AR, Zhuge Y, Perez EA, Koniaris LG, Lew JI, Sola JE. The incidence of pediatric thyroid cancer is increasing and is higher in girls than in boys and may have an adverse outcome. *Journal of Surgery Research* 2009; 156:167-72.
- Hong SJ, Kwon KW, Kim SG, Ko BM, Ryu CB, Kim YS, et al. Variation in expression of gastric leptin according to differentiation and growth pattern in gastric adenocarcinoma. *Cytokine* 2006;33:66-71.
- Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4325-31.
- Isozaki O, Tsushima T, Nozoe Y, Miyakawa M, Takano K. Leptin regulation of the thyroids: negative regulation on thyroid hormone levels in euthyroid subjects and inhibitory effects on iodide uptake and Na⁺/I⁻ symporter mRNA expression in rat FRTL-5 cells. *Endocr J*. 2004; 51(4):415-23.

Judd LM, Menheniott TR, Ling H, Jackson CB, Howlett M, Kalantzis A, et al. Inhibition of the JAK2/STAT3 pathway reduces gastric cancer growth in vitro and in vivo. *PLoS One* 2014; 9(5):e95993.

Khanafshar E, Lloyd R. The spectrum of papillary thyroid carcinoma variants. *Adv Anat Pathol* 2011; 18:90-97.

Khandekar MJ, Cohen Paul, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:886-95.

Kim WG, Choi HJ, Kim WB, Kim EY, Yim JH, Kim TY, et al. Basal STAT3 activities are negatively correlated with tumor size in papillary thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest.* 2012; 35(4):413-8.

Knauf J & Fagin J. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21(2):296-303.

Koda M, Sulkowska M, Wincerwicz A, Kanczuga-Koda L, Musiatowicz B, Szymanska M, et al. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1095-98.

Lazar L, Lebenthal Y, Steinmetz A, Yackobovitch-Gavan M, Phillip M. Differentiated thyroid carcinoma in pediatric patients: comparison of presentation and course between pre-pubertal children and adolescents. *Journal of Pediatrics* 2009; 154(5):708-14.

Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997; 138(6): 2569–76.

Lisboa PC, Oliveira KJ, Cabanelas A, Ortiga-Carvalho TM, Pazos-Moura CC. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284(6): E1172–E1176.

Liu P, Zhao L, Xu X, Liu F, Zhang W, Zhou C, et al. N(6)-Substituted adenosine analogues, a novel class of JAK2 inhibitors, potently block STAT3 signaling in human cancer cells. *Cancer Lett.* 2014; 354(1):43-57.

Liu X, Xiao Q, Bai X, Yu Z, Sun M, Zhao H, et al. Activation of STAT3 is involved in malignancy mediated by CXCL12-CXCR4 signaling in human breast cancer. *Oncol Rep* 2014; 32(6):2760-8.

LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol*, 2011; 24 Suppl 2:S1-9.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 1998; 394(6696): 897-901.

Loyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary thyroid carcinoma variants. *Head and Neck Pathol*, 2011; 5: 51-56.

Mantzoros CS, Rosen HN, Greenspan SL, Flier JS, Moses AC. Short-term hyperthyroidism has no effect on leptin levels in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 497-499.

Matias-Guiu X; Delellis R; Moley JF; Gagel RF; Albores-Saavedra J; Bussolati G; et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2004: 86-91.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes*, 2002; 26: 1407-1433.

Mchenry CR; Phitayakorn R. Follicular Adenoma and Carcinoma of the Thyroid Gland. *The Oncologist*, 2011; 16:1-9.

Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*, 2004; 50(9): 1511-25.

Nakamura T, Nagasaka S, Ishikawa S, Hayashi H, Saito T, Kusaka I, et al. Association of hyperthyroidism with serum leptin levels. *Metabolism*, 2000; 49(10):1285-8.

Newman KD, Black T, Heller G. et al. Differentiated thyroid cancer: determination of disease progression in patients <21 years of age at diagnosis: a report from the surgical discipline committee of the children's cancer group. *Ann Surg* 1998; 227(4):533-41.

Nowak KM, Kaczmarek P, Mackowiak P, Ziolkowska A, Albertin G, Ginda WJ, et al. Rat thyroid gland expresses the long form of leptin receptors, and leptin stimulates the function of the gland in euthyroid non-fasted animals. *Int J Mol Med* 2002; 9(1): 31-34.

Oge A, Bayraktar F, Saygili F, Guney E, Demir S. TSH influences serum leptin levels independent of thyroid hormones in hypothyroid and hyperthyroid patients. *Endocr J*, 2005; 52(2):213-7.

Oliveira E, Teixeira Silva Fagundes A, Teixeira Bonomo I, Curty FH, Fonseca Passos MC, de Moura EG, et al. Acute and chronic leptin effect upon in vivo and in vitro rat thyroid iodide uptake. *Life Sci*. 2007; 81(15):1241-6.

Oliveira M, Luvizotto A, Olimpio M, De Sibio T, Conde J, Biz C, et al. Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One*, 2013;18;8(9):e74856.

Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC. Leptin role in the regulation of thyrotropin secretion in fed state- in vivo and in vitro studies. *The Journal of Endocrinology* 2002; 174 (1): 121–25.

Paik SS, Jang SM, Jang KS, Lee KH, Choi D, Jang SJ. Leptin expression correlates with favorable clinicopathologic phenotype and better prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:297-303.

Pappa T & Alevizaki M. Obesity and thyroid cancer: a clinical update. *Thyroid* 2014; 24 (2): 190-199.

Park YJ, Kim YA, Lee YJ, Kim SH, Park SY, Kim KW, et al. Papillary microcarcinoma in comparison with Larger Papillary thyroid carcinoma in BRAF(V600E) mutation, clinicopathological features, and immunohistochemical findings. *Head Neck*, 2010; 32: 38-45.

Patel KN & Shaha AR. Poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. *Cancer Control*, 2006; 13(2): 119-128.

Paz-Filho G, Lim EL, Wong ML, Licinio J. Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Front Biosci*. 2011; 1(16):1634-50.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371:569-578.

Rosai, J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Londres: Elsevier, 2004. 1 v.

Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K et al. Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism*, 2005; 54(11): 1461-6.

Sassolas G, Hafdi-Nejjari H, Casagrande L, Berger C, Bournaud C, Decaussin-Petrucci M, et al. Thyroid cancers in children, adolescents, and young adults with and without a history of childhood exposure to therapeutic radiation for other cancers. *Thyroid* 2013; 23 (7): 805-810.

Seoane, L.M., Carro, E., Tovar, S., Casanueva, F.F., Dieguez, C. Regulation in vivo TSH secretion by leptin. *Regulatory Peptides* 2000; 92 (1–3):25–29.

Sera N, Yokoyama N, Abe Y, Ide A, Imaizumi M, Usa T, et al. Thyroid hormones influence serum leptin levels in patients with Grave's disease during suppression of β -adrenergic receptors. *Thyroid*, 2000; 10(8): 641-6.

Sesnilo G, Casamitjana R, Halperin I, Gomis R, Vilardell E. Role of thyroid hormones on serum leptin levels. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 428 – 430.

Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 1998; 281:1683-86.

Silver CE, Owen PR, Rodrigo JP et al. Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Head Neck*, 2011; 33(7): 1052-9.

Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C.; Amaro T. Follicular thyroid carcinoma. *Mod Pathol*, 2011; 24, S10-18.

Suster S. Thyroid tumors with a follicular growth pattern: problems in differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*, 2006; 130, 984-8.

Uddin S, Bavi P, Siraj AK, Ahmed M, Al-Rasheed M, Hussain AR, et al. Leptin-R and its association with PI3K/AKT signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 2010; 17: 191-202.

Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, Khan OS, Bavi PP, Al-Kuraya KS. Role of leptin and its receptors in the pathogenesis of thyroid cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011; 4(7):663-643.

Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, et al. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 1998, 47: 913-917.

Vaisman F., Corbo R, Vaisman M. Thyroid carcinoma in children and adolescents-systematic review of the literature. *J Thyroid Res*. 2011;2011:845362.

Viguerie N, Millet L, Avizou S, Vidal H, Larrouy D, Langin D. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87(2):630-4.

von Manstein V, Yang CM, Richter D, Delis N, Vafaizadeh V, Groner B. Resistance of Cancer Cells to Targeted Therapies Through the Activation of Compensating Signaling Loops. *Curr Signal Transduct Ther* 2013; 8(3):193-202.

Vriens M, Moses W, Weng J, Peng M, Griffin A, et al. Clinical and molecular features of papillary thyroid cancer in adolescents and young adults. *Cancer* 2011, 117(2):259-67.

Williams ED. Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man. *Mutation Research* 1995; 333: 123-129.

Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. *Oncologist* 2010; 15(6):556-65.

Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res*, 2007 14;101(6):545-59.

Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, Saruta T. Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clin Endocrinol*, 1998; 48(3):299-302.

Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 822 – 826.

Yuan SS, Tsai KB, Chung YF, Chan TF, Yeh YT, Tsai LY, et al. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 92:769-75.

Zhang GA, Hou S, Han S, Zhou J, Wang X, Cui W. Clinicopathological implications of leptin and leptin receptor expression in papillary thyroid cancer. *Oncol Lett*. 2013; 5(3):797-800.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-32.

Zhao X, Huang K, Zhu Z, Chen S, Hu R. Correlation between expression of leptin and clinicopathological features and prognosis of patients with gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:1317-21.

Zimmermann-Belsing T, Brabant G, Holst, JJ, Felt-Rasmussen U. Circulating leptin and thyroid dysfunction. *Eur J Endocrinol*, 2003; 149: 257-71.

Zimmerman D, Hay ID, Gough IR et al. Papillary thyroid carcinoma in children and adults: long-term follow-up of 1039 patients conservatively treated at one institution during three decades. *Surgery*.1988; 104(6):1157-66.