

Marcos Emanuel de Alcântara Segura

**A EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 COMO MARCADOR
DE MALIGNIDADE DE NEOPLASIAS DE TIREÓIDE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela bênção da realização de minha vocação, pela oportunidade de me dedicar à medicina e à pesquisa científica.

Aos meus pais e avô, pelo amor e carinho e pelos incontáveis exemplos de ética e dedicação profissional.

Ao professor Albino Versoça de Magalhães por tantos anos como orientador.

Aos funcionários das unidades de anatomia patológica do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital de Base do Distrito Federal.

Especial gratidão tenho com os renomados profissionais que me aconselharam antes, durante e após a conclusão deste trabalho.

À minha esposa Denise com quem divido todas as minhas conquistas e para quem dedico todo meu esforço.

*Confie no Senhor e faça o bem;
assim você habitará na terra
e desfrutará segurança.
Deleite-se no Senhor,
e ele atenderá aos desejos do seu coração.
Entregue o seu caminho ao Senhor;
confie nele e ele agirá.*

Salmos, capítulo 37, versículos 3 a 5

RESUMO

Apesar da punção aspirativa por agulha fina da tireóide ser o melhor teste propedêutico na avaliação do nódulo tireoidiano, existem casos suspeitos que não podem ser definidos citologicamente como malignos ou benignos. Diante desses casos indefinidos, os cirurgiões optam pela tireoidectomia, não por um ato terapêutico, mas diagnóstico. O resultado disso é que a maioria dos nódulos suspeitos é operada e, no exame histopatológico, mais de dois terços são classificados como benigno (bócios, hiperplasias e adenomas), tendo o procedimento cirúrgico sido realizado sem necessidade, portanto gerando grandes gastos hospitalares e causando eventuais morbidades relacionadas com a cirurgia radical da tireóide. A partir disso buscou-se ao longo dos anos, um marcador molecular que diferenciasse, nos esfregaços citológicos, quais materiais eram provenientes de nódulos benignos ou malignos. A galectina-3 é apontada pela literatura com um dos principais candidatos para essa função. Para se testar essa hipótese foi feito um estudo retrospectivo para pesquisa da galectina-3, através de imunohistoquímica, em produtos de tireoidectomia. Foram selecionados 15 casos de bócio adenomatoso, 24 de adenoma folicular, 29 de carcinoma papilar e 22 de carcinoma folicular. A expressão da galectina-3 foi comparada com o diagnóstico histopatológico (padrão-ouro). Os valores para a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia diagnóstica, “Likelihood Ratio” Positiva e “Likelihood Ratio” Negativa da positividade citoplasmática foram respectivamente de 92,16%, 94,38%, 90,38%, 95,45%, 93,57%, 16,40 e 0,08. Após correção da prevalência para 5%, o valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia diagnóstica passaram a ser 46,33%, 99,56% e 94,27%. Esses dados, obtidos em preparados histológicos, sugerem que a pesquisa da galectina-3 em esfregaços citológicos poderá ser um importante auxílio para a definição diagnóstica.

ABSTRACT

Fine needle aspiration biopsy is considered to be the best propedeutic method used in evaluation of a thyroid nodule. However, in some situations, it is impossible to cytologically distinguish a malignant and a benign disease; therefore, surgeons must indicate thyroidectomy for a diagnostic purpose. This results that most suspect nodules are referred to surgery and, in histopathologic analysis, more than two thirds are considered benign (goiters, hyperplasias and adenomas). This situation lead to a search for a molecular marker that could discriminate, on cytological smears, those obtained from malignant nodules. Galectin-3 is considered a strong candidate for that function. To test this hypothesis a retrospective study was conducted in order to evaluate the expression of galectin-3 in thyroidectomy specimens using immunohistochemistry. Fifteen cases of nodular goiter, 24 of follicular adenoma, 29 of papillary carcinoma and 22 of follicular carcinoma were selected. Galectin-3 expression was compared to histopathologic diagnosis (gold-standard). Values for sensibility, specificity, positive predictive value, negative predictive value, diagnostic accuracy, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio were 92,16%, 94,38%, 90,38%, 95,45%, 93,57%, 16,40 and 0,08. Prevalence of disease was corrected for 5%, leading to positive predictive value, negative predictive value, diagnostic accuracy of 46,33%, 99,56% and 94,27%. This data, suggest that galectin-3 could be an important aid in diagnostic definition.

SUMÁRIO

Resumo.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
3 OBJETIVOS.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5 RESULTADOS.....	26
6 DISCUSSÃO.....	28
7 CONCLUSÃO.....	33
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
9 Anexo I.....	44
10 Anexo II.....	46

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que os carcinomas tireoidianos representem cerca de 1% de todas as neoplasias malignas (1). Na Europa e nos Estados Unidos da América, a prevalência corresponde a aproximadamente quatro casos por 100.000 habitantes. No Distrito Federal entre 1996 e 1998 foram descritos 233 casos novos. Neste período a taxa de mortalidade variou entre 0,32 a 0,61 para o sexo feminino e 0,11 a 0,43 para o sexo masculino, sendo responsável por 115 óbitos durante o período de 1979 a 1998 (2).

O câncer de tireóide manifesta-se como nodulação do parênquima tireoidiano, sendo o nódulo único sua principal característica. No entanto, outras condições patológicas podem se manifestar através de nódulos, sendo necessário uma abordagem sistemática dos pacientes, pois os casos suspeitos e os com confirmação de malignidade devem ser encaminhados para a tireoidectomia. Na propedêutica do nódulo tireoidiano existem alguns fatores relacionados a maior risco de malignidade. Por exemplo: pacientes do sexo masculino, com nódulo único e hipocaptante à cintilografia são considerados de grande probabilidade de serem portadores de câncer. Enquanto que em mulheres, tireóides multinodulares e hipercaptantes há maior probabilidade de tratar-se de doença benigna (bócios, hiperplasias ou adenomas).

Porém nenhuma dessas características é definitiva (3), e muitos pacientes com doenças benignas são submetidos à tireoidectomia para diagnóstico. A punção por agulha fina (PAAF) da tireóide vem sendo aplicada rotineiramente nessa investigação, nos últimos 30 anos. É considerada como o teste de maior acurácia para a distinção entre nódulos de natureza benigna e maligna (3-5).

Mas, como todo método diagnóstico, também apresenta limitações como amostragem inadequada e mesmo incapacidade de distinção entre hiperplasias, adenoma folicular e o carcinoma folicular. Dessa maneira, outras características (moleculares, por exemplo) vêm sendo pesquisadas como potenciais auxílios nessa investigação. A galectina-3, uma molécula envolvida com a carcinogênese das células foliculares, é apontada pela literatura como um desses potenciais marcadores de malignidade (6).

A presente dissertação pretende descrever o estado da arte na investigação do câncer de tireóide, enfocando as características e dificuldades do diagnóstico morfológico, e também analisar, experimentalmente, a expressão da Galectina-3 como um possível marcador de malignidade para tumores da tireóide.

2. REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças malignas da tireóide podem ser classificadas como carcinomas, sarcomas, linfomas e ainda tumores metastáticos (7). Os carcinomas primários são os mais freqüentes, responsáveis por cerca de 98% das neoplasias malignas (1), e são classificados como carcinoma papilar de tireóide, carcinoma folicular de tireóide, carcinoma medular de tireóide e carcinoma indiferenciado (anaplásico) de tireóide. Os carcinomas foliculares, papilares e indiferenciados têm origem no epitélio folicular, enquanto o carcinoma medular é originário das células C - parafoliculares. O carcinoma folicular e o carcinoma papilar são reconhecidos como carcinomas bem diferenciados de tireóide. Essa classificação histológica se reflete em diferentes comportamentos de prognóstico e características epidemiológicas.

A etiologia da maioria dos cânceres tireoidianos é desconhecida. Sabe-se que os carcinomas diferenciados ocorrem mais comumente na forma esporádica, havendo poucos casos (de 3 a 7%) com recorrência familiar (1). A radiação ionizante é o único fator externo claramente identificável como causador de carcinoma de tireóide, principalmente o carcinoma papilar (1). Tanto o excesso como a falta de iodo, também foram responsabilizados, em estudos epidemiológicos (8).

O desastre nuclear ocorrido na cidade de Chernobyl, em 1986, demonstrou o impacto da radiação na incidência de câncer tireoidiano (9), principalmente de carcinoma papilar em crianças. Entre os anos de 1976 e 1985, a taxa de câncer de tireóide em crianças da Bielorrússia foi de 0,5 (média anual por um milhão de crianças). Mas após o acidente nuclear, e a exposição dos cidadãos à radiação ionizante, entre 1986 e 1991, essa taxa aumentou para 10,5 (10). A conexão entre a incidência de carcinoma papilar e a radiação é explicada pelos rearranjos gênicos envolvendo o proto-oncogene RET (10q11.2) (11).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E MORFOLÓGICAS DOS CARCINOMAS DE TIREÓIDE

Carcinoma Papilar de Tireóide

A OMS define o carcinoma papilar de tireóide como um tumor epitelial apresentando evidência de diferenciação para célula folicular e apresentando características nucleares distintas (12). Representa cerca de 80% de todas as neoplasias

malignas da tireóide, acometendo principalmente indivíduos na 3ª a 5ª décadas de vida, sendo mais freqüente em mulheres (13). Sua prevalência é mais comum em populações com dieta suficiente de iodo (1).

O aspecto macroscópico do carcinoma papilar corresponde a um tumor sólido, firme, de coloração branco-amarelada, com bordos irregulares e infiltrados. O tumor pode ser encapsulado e, em alguns casos, associado a calcificações. Além disso, é comum ao carcinoma papilar ser multifocal. Lesões císticas podem ser vistas e, às vezes, existe uma protusão papilar para dentro deste cisto. Áreas hemorrágicas e de necrose assim como extensão para tecidos adjacentes podem ser evidenciados em tumores maiores e em variantes agressivas.

O diagnóstico histopatológico do carcinoma papilar é baseado em características citológicas e arquiteturais, não havendo uma única alteração isolada que seja diagnóstica (13). São reconhecidas as variantes histológicas clássica, folicular, oxifílica, de células claras, esclerosante difusa, de células altas, de células colunares e a variante insular/sólida, a depender dos padrões de crescimento e morfologia celular. Existem vários padrões de crescimento como: papilar, sólido, trabecular, folicular e cístico. No entanto são as características nucleares as mais importantes para se firmar o diagnóstico de carcinoma papilar, mantendo-se constantes entre as diversas variantes histológicas (13).

Essa morfologia nuclear é definida como núcleos aumentados de tamanho, de forma oval a redonda, com anisocariose, havendo sobreposição nuclear, perda da polaridade e desorganização do núcleo dentro da célula. A cromatina é pálida, com condensação na periferia (cromatina em “vidro de relógio”) (14). Notam-se fendas e pseudoinclusões citoplasmáticas intranucleares, estas últimas encontradas em até 2/3 dos casos (15). Essas pseudoinclusões representam invaginações da membrana celular (16). A morfologia do citoplasma tem sua utilidade na classificação das variantes histológicas (variante de células oxifílicas, de células claras, etc.). Outros elementos observados são células gigantes em meio ao colóide, corpos de *psammomas* e metaplasia escamosa do epitélio folicular.

De forma resumida, as variantes histológicas são caracterizadas da seguinte maneira: 1) Variante Folicular: geralmente são tumores encapsulados, constituídos por folículos pequenos e justapostos com colóide hipereosinofílico, projeções papilares raras; 2) Variante Oxifílica: macroscopicamente são tumores de cor acastanhada a marrom, encapsulados. Apresenta arquitetura papilar arborizante, com células de

citoplasma abundante, finamente granular e eosinofílico, característico das células oncócicas; 3) Variante de Células Claras: padrão de crescimento papilar ou folicular com presença de células de citoplasma claro; 4) Variante Esclerosante Difusa: caracteristicamente se desenvolve em pacientes jovens (em média com 18 anos de idade) e apresenta acometimento difuso de ambos os lobos com elevada frequência de comprometimento de linfonodos à época do diagnóstico. Histologicamente têm-se uma fibrose exarcebada, com numerosos corpos de *psammoma*, com extensão extra-tireoidiana e vascular, metaplasia escamosa florida em um fundo de tireoidite linfocítica; 5) Variante de Células Altas: esta variante tende a se apresentar mais comumente em homens com idade superior a 60 anos e ter grandes dimensões (maiores que 5cm). Apresenta padrão de crescimento papilar com células tendo a altura pelo menos 3 vezes maior que a sua espessura, e bordos citoplasmáticos bem definidos; 6) Variante de Células Colunares: padrão de crescimento papilar com células colunares de arranjo sincicial, e estratificação dos núcleos alongados; 7) Variante Insular / Sólida: caracterizada pela formação de ninhos celulares com escasso colóide e células apresentando relação núcleo/citoplasma aumentada.

Entre os carcinomas tireoidianos, o carcinoma papilar é o que apresenta menor dificuldade para o diagnóstico citopatológico. Com uma amostragem adequada, a acurácia diagnóstica chega em torno de 90% (17;18), devido às marcantes características nucleares do carcinoma papilar, facilmente avaliadas pelo exame citopatológico.

O diagnóstico baseia-se no padrão arquitetural dos fragmentos teciduais, morfologia celular e características do fundo. Os esfregaços são hipercelulares com pouco colóide (15). As células estão arranjadas em agrupamentos sinciciais com configuração papilar (agregados em dedo de luva com padrões ramificados, contornos externos lisos e paliçada periférica). Papilas verdadeiras estão presentes em até 60% dos casos (19). Ressalva-se que um eixo vascular revestido por epitélio não faz necessariamente o diagnóstico de carcinoma papilar uma vez que o bócio nodular e neoplasias foliculares podem apresentar estruturas semelhantes, com células epiteliais aderidas a vasos centrais (15). As características nucleares descritas no exame histopatológico são facilmente observadas nos esfregaços, observando-se núcleos aumentados com variação do tamanho e contornos irregulares. A cromatina é fracamente corada nos preparados com o corante de Papanicolaou, mostrando-se opaca e homogênea (20). A apresentação nuclear “em vidro de relógio” que é notada em

cortes histológicos não é facilmente caracterizada nos esfregaços citológicos e, portanto, é considerada um artefato de fixação (21). É observado um micronúcleo aderido na carioteca enquanto que macronúcleos raramente são vistos. As células neoplásicas apresentam citoplasma denso com bordas bem definidas (15;19). Fendas e inclusões citoplasmáticas intranucleares são observadas (22), assim como corpos de *psammoma*, colóide espesso e células gigantes multinucleadas.

A frequência e a confiabilidade dos critérios citomorfológicos citados podem variar. Nenhuma destas características é exclusiva do diagnóstico de carcinoma papilar, podem estar presentes no bócio nodular e em outras neoplasias de tireóide. Foram descritas, com menor frequência que no carcinoma papilar, inclusões nucleares em bócio nodular, carcinoma medular, neoplasias foliculares, tumor de células de Hürtle, adenoma hialinizante trabecular e também nas tireoidites (23).

Apesar de existir uma forte associação estatística dos corpos de *psammomas* com o carcinoma papilar, estes achados são vistos em 1 a 2% dos casos de bócio nodular, doença de Graves, tireoidite e hiperplasia papilar (24;25). A distinção citopatológica entre a hiperplasia papilar e o carcinoma papilar pode apresentar dificuldades (15). Um nódulo com hiperplasia papilar apresenta algumas características citológicas do carcinoma papilar (agregados papilares, núcleos sobrepostos, invaginações nucleares e corpos de *psammomas* ocasionais). Entretanto, na hiperplasia papilar, os núcleos são uniformes e contêm cromatina finamente dispersa (24). A apresentação cística do carcinoma papilar ocorre frequentemente e é fonte de resultados falso-negativos devido a erros de amostragem e também a diluição das células epiteliais no fluido do cisto (26;27). De fato, em um estudo com 555 casos de aspiração com agulha fina, que foram submetidos subsequentemente a tireoidectomia, concluiu-se que o erro diagnóstico ocorreu mais frequentemente em amostragem inadequada de lesões císticas (28). Dessa forma, alguns casos de carcinoma papilar podem ter um laudo citopatológico inconclusivo, ou “suspeito para malignidade” pois só algumas características do carcinoma papilar podem estar presentes sem, no entanto, garantir um diagnóstico seguro.

O carcinoma papilar tem preferência por metástases linfáticas, em linfonodos cervicais locais (29). Entretanto o prognóstico é excelente para a variante clássica, com sobrevivência em 20 anos superior a 98% (13). A cirurgia é o tratamento de escolha, apesar da extensão do procedimento (lobectomia vs tireoidectomia subtotal vs tireoidectomia total) continuar controversa (13). Devido ao fato de alta frequência de multifocalidade

para o carcinoma papilar a tireoidectomia total vêm sendo apontada como principal escolha (30). Reconhece-se complicações frequentes para a tireoidectomia total como o dano ao nervo laríngeo recorrente e o hipoparatiroidismo (31). Terapia com iodo radioativo pode ser indicada após a tireoidectomia total (13).

As variantes folicular, oncocítica e de células claras são consideradas de igual prognóstico quando comparadas à forma clássica. A variante esclerosante difusa apresenta propensão à disseminação hematogênica, e comprometimento dos tecidos extra-tireoidianos conferindo um pior prognóstico quando comparada à forma clássica (32). No entanto a tireoidectomia total associada à dissecação dos linfonodos cervicais, juntamente com a terapia radioablativa modificam para melhor o prognóstico dessa variante biologicamente agressiva (13). A variante de células altas por afetar preferencialmente indivíduos idosos e apresentar frequentemente extensão extra-tireoidiana é também considerada de pior prognóstico do que a forma clássica (33).

Carcinoma Folicular de Tireóide

A OMS define o carcinoma folicular de tireóide como uma neoplasia epitelial maligna com diferenciação para células foliculares na qual faltam as características nucleares do carcinoma papilar (34). Corresponde a 10 a 20% de todas as neoplasias primárias da tireóide (35), mas em regiões deficientes de iodo apresentam incidência aumentada (36). Afeta preferencialmente mulheres de meia idade e raramente acomete crianças. Em casos raros, a manifestação inicial pode ser de metástases à distância para osso, pulmão ou cérebro.

Macroscopicamente o carcinoma folicular tende a ser solitário, unifocal e encapsulado. A superfície de corte tem coloração amarelada e as formas amplamente invasivas contêm hemorragia, necrose e ainda invasão óbvia do parênquima tireoidiano.

Vários padrões microscópicos de crescimento podem ser observados no carcinoma folicular (folicular, trabecular, insular e sólido), mas eles não constituem variantes histológicas. Geralmente o carcinoma folicular é hipercelular, constituído por numerosos folículos com células morfológicamente distintas do parênquima tireoidiano normal, sendo cuboidais ou colunares baixas, raramente fusocelulares. Figuras mitóticas e necrose podem ser observadas, mas as degenerações são mais frequentes.

A característica diagnóstica que define o carcinoma folicular e o distingue dos adenomas e hiperplasias nodulares é a invasão capsular e/ou vascular. Isto significa que a cápsula desses tumores deve ser exaustivamente estudada (35). Alta celularidade,

padrão de crescimento sólido ou pleomorfismo nuclear não são *per se* evidência de malignidade. Os tumores apresentando essas características, mas sem invasão capsular e/ou vascular após um estudo detalhado, podem ser seguramente classificados como Adenoma Folicular ou Adenoma Atípico (35). Focos únicos ou múltiplos de células neoplásicas podem ser observados penetrando a cápsula parcialmente ou totalmente. Existe controvérsia sobre se a invasão capsular parcial tem o mesmo significado da invasão total (por toda a extensão da cápsula) (37;38). Hoje, o conceito mais aceito no meio científico é que somente a invasão completa da cápsula deverá ser considerada como evidência de malignidade (35;38).

O acometimento vascular pode ocorrer em vasos de variados tamanhos. A invasão vascular é definida como extensão direta do tumor para o lúmen vascular, ou um trombo neoplásico aderente à parede vascular, necessitando que esses ninhos neoplásicos estejam cobertos por endotélio ou associados a trombos de fibrina (39). O vaso acometido deve estar localizado na cápsula ou fora do tumor. Esses critérios morfológicos estritos são necessários para se evitar uma interpretação errônea baseada em artefatos processuais nos quais células foliculares são mecanicamente desalojadas, durante o corte, e implantadas no interior dos vasos (35).

O carcinoma folicular minimamente invasivo constitui uma variante histológica, caracterizada por apresentar invasão capsular focal havendo polêmica sobre a invasão vascular (37;38). Não existe definição quanto ao número de focos invasivos para essa classificação. O carcinoma folicular amplamente invasivo representa uma variante mais rara com infiltração acentuada do parênquima tireoidiano e até mesmo dos tecidos extra-tireoidianos, já denotando ampla invasão capsular e vascular. O carcinoma folicular oncocítico é constituído em mais de 75% por células com características oxifílicas.

Como já relatado, a distinção entre um nódulo hiperplásico (adenomatóide), um adenoma folicular e o carcinoma folicular recai na demonstração de invasão capsular e/ou vascular. Desse modo a PAAF desses nódulos suspeitos não é conclusiva (40;41) devido à impossibilidade da avaliação daqueles elementos morfológicos nos esfregaços. Geralmente o quadro citopatológico se apresenta hipercelular com arquitetura microfolicular dispersa ou em agregados tridimensionais. As células podem apresentar variação no tamanho e na forma celular e nuclear. O colóide, por regra, é escasso. Os laudos citopatológicos do carcinoma folicular são concluídos de forma vaga como, por exemplo, “processo proliferativo folicular favorecendo neoplasia”. O que se traduz

cl clinicamente como um tumor que requer intervenção cirúrgica para definição diagnóstica. E apenas de 20 a 30% desses casos serão de fato classificados como malignos no exame histopatológico (42-45). Dessa forma o diagnóstico citopatológico de “proliferação folicular favorecendo neoplasia” pertence a uma categoria indeterminada na classificação das PAAF de tireóide (37).

Alguns estudiosos sugeriram que os casos diagnosticados como “neoplasia folicular” pelo exame citopatológico possam ser estratificados em lesões com alto risco para malignidade e lesões que possam ser acompanhados clinicamente (42;46). Em um estudo com 219 pacientes, foi demonstrado que lesões com grandes dimensões, fixação da massa aos tecidos vizinhos e pacientes jovens estão associados a maior risco de malignidade (43). Também já foram correlacionados com maior probabilidade de malignidade pacientes com mais de 40 anos, diagnóstico de neoplasia de células de Hürthle, nódulos maiores que 3 cm e sexo masculino (37;46).

Nas últimas décadas houve uma melhora do prognóstico do carcinoma folicular, devido em parte a um diagnóstico mais precoce. De maneira geral o carcinoma folicular minimamente invasivo, quando corretamente tratado, tem uma sobrevida em 20 anos superior a 95% (38;47), se assemelhando à curva de sobrevivência dos pacientes do grupo controle. A variante amplamente invasiva, ao contrário tem um comportamento biológico mais agressivo com sobrevida em 10 anos de aproximadamente 30% (38). As metástases são geralmente para os pulmões e osso. O carcinoma folicular variante oxifílica não apresenta diferenças no prognóstico quanto às demais variantes. Existem controvérsias na literatura para o tratamento cirúrgico indicado do carcinoma folicular. A abordagem cirúrgica pode ser mais conservadora (lobectomia) ou radical (tireoidectomia). Alguns estudos mostram que a tireoidectomia total não acarreta em benefícios para o prognóstico do paciente quando comparada com a lobectomia (48). No entanto, a cirurgia radical permite a negativação da tireoglobulina, facilitando o monitoramento clínico por avaliação laboratorial.

Carcinoma Indiferenciado de Tireóide

Representa de 3 a 5% dos carcinomas da tireóide (49). Ocorre predominantemente em mulheres idosas (50). Clinicamente, o carcinoma indiferenciado se apresenta como massa cervical de crescimento rápido associado a sintomas de disfagia e rouquidão, dispnéia e linfadenopatia (50). Trata-se de uma enfermidade potencialmente letal, cujo diagnóstico geralmente é tardio resultando num tratamento ineficaz e prognóstico

sombrio (49). De fato em metade dos casos a lesão é inoperável (35). Apesar do tratamento a maioria dos pacientes morre em até 1 ano após o diagnóstico, com sobrevida mediana de 3 a 4 meses (35;50).

Macroscopicamente esses tumores são grandes massas que ultrapassam a cápsula da tireóide e se estendem para os tecidos adjacentes, traquéia e linfonodos. A superfície de corte apresenta substituição do tecido tireoidiano normal por uma massa amarelada, necrótica e hemorrágica.

São reconhecidos 3 padrões arquiteturais microscópicos: células fusiformes, células gigantes e escamóide (50). A variante de células fusiformes deve ser diferenciada dos sarcomas como o fibrossarcoma, rhabdomyosarcoma, hemangiopericitoma e histiocitoma fibroso maligno. As células apresentam pleomorfismo e atividade mitótica. Necrose é comum e pode ser extensa.

Os esfregaços citopatológicos do carcinoma indiferenciado são altamente celularizados, apesar de tumores com muita fibrose impedirem o desprendimento celular durante a punção (51). São observadas células bizarras com evidências inequívocas de malignidade, isoladas ou em pequenos grupos, mostrando pleomorfismo e variação de tamanho importante – lembrando esfregaços de sarcomas de alto grau (52). Neutrófilos e detritos celulares são observados ao fundo. O esfregaço é claramente diagnóstico de processo maligno devendo-se diferenciar de carcinoma medular, lesões metastáticas (carcinoma de células renais ou melanoma), histiocitoma fibroso maligno e outros sarcomas.

Carcinoma Medular de Tireóide

Constitui um tumor maligno com diferenciação para a célula C parafolicular (35). Ocorre mais comumente na forma esporádica, mas a forma familiar pode representar mais de 20% dos casos (53). É uma neoplasia secretora do antígeno carcinoembrionário (CEA), sendo sintomas comuns a diarreia e mais raramente a síndrome de Cushing, devido à secreção paraneoplásica de peptídeos com ação hormonal (32). A sobrevida em 5, 10 e 15 anos é respectivamente de 65 a 87%, 51 a 78% e 65% (35).

São frequentemente encapsulados à macroscopia, tendo uma consistência firme, e cor branco-acinzentada. É mais comum no terço médio dos lobos, onde as células C parafoliculares são mais comuns.

Histologicamente caracteriza-se por uma variedade de padrões (ninhos, cordões, placas e trabéculas) com células variando de poligonais a fusocelulares. Os núcleos dessas células são redondos a ovais e apresentam uma cromatina finamente granular. Além do amilóide, o carcinoma medular pode conter mucina, melanina e vários hormônios polipeptídeos demonstráveis por imunohistoquímica. A característica destes tumores é a produção de calcitonina, CEA, cromogranina, sinaptofisina e enolase neurônio-específica (estas 3 últimas freqüentes em tumores neuro-endócrinos).

Citologicamente é fácil a distinção do carcinoma medular quando presentes as células neuroendócrinas e amilóide (52). No entanto uma das características do carcinoma medular é se apresentar de formas citomorfológicas bastante distintas. Existe uma mistura de células fusocelulares, poligonais e redondas, mas caracterizadas pela cromatina típica (em “sal e pimenta”).

A INVESTIGAÇÃO DO NÓDULO TIREOIDIANO

O principal sinal do câncer de tireóide é o nódulo palpável, no entanto a grande maioria destes é benigna. A prevalência de nódulos tireoidianos na população varia de acordo com os métodos empregados. Nas autópsias de pacientes assintomáticos, verificou-se que 50% dos casos apresentavam nódulos tireoidianos (54). Enquanto que à ultra-sonografia esses valores foram de 67% (55). É importante ressaltar que somente 5% desses nódulos são malignos (56;57), tornando-se necessária uma investigação sistemática, pois as neoplasias malignas devem ser tratadas cirurgicamente (58).

Se os nódulos tireoidianos fossem excisados de forma indistinta - sem uma investigação pré-cirúrgica criteriosa - grande parte das cirurgias seria desnecessária. E esse, de fato, era o cenário antes do uso da PAAF de tireóide. O médico na investigação de um nódulo tireoideano, diante da dúvida se a doença era maligna ou benigna, indicava a cirurgia. Porém no período pós-operatório, após o estudo histopatológico, sabia-se que grande parte dos casos era benigna, tendo o procedimento cirúrgico sido indicado de forma desnecessária. Grandes gastos hospitalares e eventuais morbidades eram as conseqüências dessa incerteza.

Koss e cols., em 1992, verificaram que após a introdução da PAAF de tireóide o número de câncer presente nos produtos de tireoidectomia dobrou, de 16% para 31% (59). Esses dados são confirmados por outros estudos mostrando um aumento de proporção de câncer nos produtos de tireoidectomia de 20 para até 50% (60). Em outra

pesquisa, verificou-se uma redução de mais de 30% nas operações realizadas para doenças benignas, o que acarretou em declínio do custo por paciente de 25% (61).

De todos os testes de investigação dos nódulos tireoidianos, a PAAF é o mais acurado, simples e rápido, além de ter um elevado custo/benefício (3;4). Trata-se de um procedimento ambulatorial em que o conteúdo do nódulo em investigação é aspirado com o auxílio de uma agulha fina e seringa e, após, espalhado em lâminas convencionais podendo ser fixado ao ar (para colorações com a técnica de May-Grunwald-Giemsa) ou com álcool etílico 95% (colorações de Papanicolaou ou Hematoxilina e Eosina). O procedimento não apresenta complicações sérias, apenas desconfortos locais e momentâneos como leve dor na região e hematomas (60).

Os laudos citopatológicos de tireóide não são padronizados, variando bastante entre as instituições. Alguns citopatologistas preferem classificar nosologicamente o esfregaço como “Bócio colóide” ou “Carcinoma Papilar”, outros utilizam algumas propostas de classificação feitas por sociedades. Para fins de pesquisa e comparação de estudos os resultados da PAAF de tireóide podem ser divididos em: negativo(benigno), suspeito (indeterminado), positivo (maligno) e não diagnóstico(insatisfatório) (60).

As conclusões não diagnósticas (insatisfatórias) se referem às amostras impróprias para interpretação citopatológica, geralmente devido a conteúdo cístico ou material hemorrágico contendo poucas células foliculares (60). Esfregaços contendo no mínimo 6 agrupamentos (em algumas instituições esse número é de 10 a 15) são considerados satisfatórios para a análise (62). Na maioria dos serviços a taxa de material insatisfatório varia de 7 a 20%, e apesar da experiência (dos citopatologistas) ajudar na redução dessa taxa, um residual de 10% de material insatisfatório se mantém (60;63;64).

Sem dúvida, a introdução da PAAF de tireóide, há mais de três décadas, melhorou a capacidade diagnóstica no período pré-operatório, discriminando quais nódulos são malignos e indicados para uma terapêutica cirúrgica adequada (60). Entretanto, os benefícios se limitaram a isso, e desde sua introdução na prática clínica não houve mais avanços no diagnóstico citopatológico do câncer de tireóide (44).

A citopatologia da tireóide enfrenta hoje um importante dilema, nos casos com resultados indeterminados, que chegam a 30% do total de aspirados (60). Esses, em sua maioria, constituem as conclusões “proliferação folicular” (41) que refletem a incapacidade do exame citopatológico em detectar invasão capsular e/ou vascular, critérios essenciais para o diagnóstico do carcinoma folicular (37;40). Apesar da grande maioria desses nódulos indeterminados ser tanto hiperplásicos ou adenomas foliculares,

cerca de 20 a 30% são, de fato, carcinoma folicular ou a variante folicular do carcinoma papilar (42-45), como já relatado antes. A impossibilidade de se atestar malignidade nessas lesões foliculares não papilares (37), em materiais provenientes de PAAF, gera grande ansiedade para a equipe médica (cirurgião, endocrinologista e citopatologista) e para o paciente, e o tratamento cirúrgico acaba sendo indicado por experiência clínica ou mesmo por fatores sociais (65).

Várias tentativas de combinação de elementos citomorfológicos foram feitas para se definir se uma “lesão proliferativa folicular” é um nódulo hiperplásico ou uma neoplasia. A avaliação da arquitetura folicular, características nucleares e celularidade já foram estudadas como critérios para ajudar nessa distinção (5). Porém quando esses critérios citopatológicos são correlacionados com o estudo histopatológico, nenhum tem significância estatística (66).

A sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica da PAAF de tireóide na distinção entre lesões malignas e benignas podem ser obtidas ao se comparar os resultados do exame citológico (PAAF) com padrão ouro: o resultado do exame histopatológico da glândula excisada (20). Vários estudos realizaram essa observação. Porém existem grande diferenças, consequência da variedade de critérios metodológicos adotados, principalmente na classificação dos nódulos suspeitos. Alguns estudos relatam apenas os casos certamente malignos ou benignos, outros consideram os adenomas como positivos. Essas decisões obviamente terão consequências no resultado final do estudo. Por exemplo, se os casos suspeitos citopatologicamente são considerados positivos (quando comparados com o exame histopatológico), então a sensibilidade irá aumentar e a especificidade diminuir. Ao contrário, se os pesquisadores considerarem os resultados suspeitos como negativo, a especificidade irá aumentar e a sensibilidade diminuir. Considerando essa possível interferência no resultado, foi feito um estudo de meta-análise contendo sete relatos anteriores somando um total de 18183 casos de PAAF (60). A sensibilidade variou de 65% a 98% (média ponderada de 83%) e a especificidade de 72% a 100% (média ponderada de 92%). Estudos posteriores verificaram resultados semelhantes com sensibilidade de 78% a 94% e especificidade de 96% a 99% (3;63;67-69). Esses resultados demonstram que a PAAF de tireóide tem a especificidade um pouco mais elevada do que a sensibilidade, segundo esse estudo.

Considerando que o maior impacto da PAAF de tireóide é na indicação de um procedimento cirúrgico, Cap e colaboradores, em 1999, analisaram a capacidade da

PAAF em indicar corretamente a cirurgia em nódulos tireoidianos. Os resultados citológicos foram divididos em suspeitos de malignidade e não suspeitos. Os resultados suspeitos foram considerados como verdadeiros positivos somente nos casos com comprovação histológica de malignidade, e não em casos com diagnóstico final de adenoma. Verificou-se que a sensibilidade foi de 86%, especificidade de 74%, valor preditivo positivo de 34%, valor preditivo negativo de 97% e acurácia diagnóstica de 75% (64).

Esses resultados diferem muito quando comparados aos anteriormente descritos e seguem a seguinte explicação: nos estudos com alta sensibilidade e alto valor preditivo positivo, somente os casos claramente benignos ou malignos eram considerados no cálculo dos índices, omitindo uma grande proporção de casos suspeitos. Se os cálculos estatísticos de um desses estudos (69) fossem refeitos, considerando os casos suspeitos (que indicam cirurgia) como positivos, a especificidade cai de 98 para 46% e o valor preditivo positivo de 98,3 para 44% (64). Além do mais alguns estudos consideram como negativos os casos que tiveram um seguimento clínico sem evidência de câncer, e não casos com exame histopatológico negativo (64), um grave erro metodológico.

Para complementar essa investigação diagnóstica, alguns grupos propõem a realização de uma biópsia com agulha grossa, fornecendo material suficiente para um estudo histopatológico. Esse procedimento associado à PAAF em nódulos com padrão folicular melhorou a categorização de nódulos hiperplásicos e neoplásicos (5;70;71).

Até hoje não existem marcadores clínicos, radiológicos ou testes laboratoriais com sensibilidade e especificidade suficiente para distinguir inequivocadamente se uma lesão proliferativa com padrão folicular da tireóide é maligna ou benigna (72). Dessa maneira, qualquer dado que puder melhorar a indicação dos procedimentos cirúrgicos da tireóide representaria um significativo avanço na abordagem desses nódulos (73). Se houvesse marcadores (clínicos, morfológicos ou moleculares) confiáveis para a detecção de células foliculares com transformação maligna, a indicação do procedimento cirúrgico seria mais apropriada.

Essa demanda desencadeou pesquisas para se encontrar moléculas estruturais e funcionais que poderiam ser usadas como marcadores de malignidade, melhorando a acurácia diagnóstica da PAAF(74). Algumas moléculas foram estudadas e propostas, como a Galectina-3, CD44v6, telomerase, HMGI(Y), fibronectina oncofetal, ciclooxigenase-2 e o HBME-1(6;75-78).

A GALECTINA-3 E OS TUMORES TIREOIDIANOS

As galectinas são moléculas da família das lectinas que apresentam pelo menos uma seqüência consecutiva de aminoácidos no domínio de reconhecimento de carboidratos e afinidade para β -galactosídeos(79). A galectina-3 foi primeiramente identificada como um marcador de diferenciação macrófágica, denominado Mac-2(80). Em sua estrutura bioquímica são reconhecidos 3 domínios: um domínio N-terminal, constituído por 20 resíduos de aminoácidos; um domínio composto por 10 repetições de aminoácidos; e um domínio de reconhecimento de carboidratos na porção C-terminal, constituído por aproximadamente 140 aminoácidos(81). A galectina-3 apresenta muitos ligantes intra e extracelulares, entre eles, as lamininas, fibronectinas fetais, mucina, IgE, Bcl-2, RNA e DNA(79). Em humanos, a galectina-3 é expressada em vários tecidos normais como o cólon, cérebro, ovário, estômago, fígado, pele, endotélio e células inflamatórias (79). Em alguns tecidos a expressão da galectina-3 é regulada durante as fases de desenvolvimento embriológico e diferenciação(82).

A galectina-3 localiza-se predominantemente no citoplasma, mas também é encontrada no núcleo, na superfície celular e extracelularmente(83), sugerindo uma multifuncionalidade para essa molécula. De fato, já foram descritas diferentes funções a depender da localização subcelular. Quando ancorada na membrana celular, a galectina-3 participa na interação célula-célula e célula-matriz (84;85). No citoplasma, exerce uma função anti-apoptótica protegendo a célula da apoptose induzida por anticorpos anti-Fas, agentes quimioterápicos, fator de necrose tumoral e óxido nítrico(86;87). A localização nuclear está envolvida no processamento do pré-RNA mensageiro (88). Sua função foi implicada também na inflamação (89) e transformação neoplásica (90).

Estudos *in vitro* demonstraram a relação entre a galectina-3 e a transformação maligna das células epiteliais da tireóide. Ao se inibir a expressão desta molécula em células de carcinoma papilar, houve uma redução no fenótipo maligno (91). Em outro estudo, a transfecção do cDNA da galectina-3 para tireócitos normais induziu uma transformação para fenótipo maligno (92). Estes dados mostram que a galectina-3 exerce uma influência na manutenção do fenótipo maligno, para as células foliculares. Foi observado, também, que nas células foliculares receptoras do cDNA da galectina-3 houve uma super-expressão dos genes do retinoblastoma (RB), antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e fator de replicação (RFC- *Replication Factor*) (92). O mecanismo bioquímico da influência da galectina-3

sobre esse padrão de expressão gênica é obscuro, mas as evidências atuais mostram que essa molécula protege a célula contra a apoptose induzindo uma fuga na fase G1 em resposta à perda da ancoragem celular. Nessa via, a galectina-3 promoveria a sobrevivência celular do êmbolo tumoral na circulação, contribuindo para a patogênese da metástase(93).

Diante da evidência da relação da galectina-3 com as neoplasias malignas de tireóide, cogitou-se na possibilidade dessa molécula ser um longamente esperado marcador de malignidade para lesões proliferativas. Um trabalho pioneiro demonstrou que a galectina-3 é expressada em altos níveis por carcinomas foliculares e papilares, e em níveis variados por carcinoma medular, não sendo expressada por adenomas(94). Essas conclusões desencadearam uma série de publicações acerca do uso dessa molécula, confirmando os achados anteriores (76;77;95-105). No prosseguir das pesquisas, o primeiro estudo multicêntrico veio validar os resultados obtidos anteriormente (6). Nesse estudo, seis centros diferentes utilizaram o mesmo anticorpo monoclonal contra a galectina-3. A conclusão dos autores foi categórica em rotular que amostras de PAAF de tireóide, que apresentem positividade para a galectina-3, sejam consideradas malignas e devam ser submetidas à tireoidectomia. Enquanto que os nódulos negativos seriam condições hiperplásicas ou adenomatosas, devendo ser seguidas clinicamente (6).

Foi verificado que a expressão da galectina-3 era restrita a tumores malignos derivados do epitélio folicular(100). Não foi demonstrada a expressão da molécula em células normais ou fetais(106), sugerindo que na tireóide, a galectina-3 tivesse um papel relacionado com a carcinogênese das células foliculares. Além disso, não foi possível demonstrar a expressão da molécula nas lesões hiperplásicas e tumores benignos. Existem estudos da expressão dessa molécula em materiais provenientes de PAAF (6;97;107;108). Diante dessas evidências, parecia que a Galectina-3 seria um marcador de malignidade para os tumores da tireóide. No entanto alguns trabalhos mostraram limitações desse método na diferenciação de nódulos malignos e benignos.

Foi verificada menor reatividade em carcinoma folicular (98;99;102), e mesmo quando presente, por vezes o era de maneira focal(109), o que poderia comprometer seu uso na prática da citopatologia por erro de amostragem. Foi verificada ainda, a expressão dessa molécula em alterações benignas como tireoidite de Hashimoto(110), adenomas(111-113), e mesmo bócio(113) utilizando-se a técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Essa metodologia para avaliação de nódulos tireoidianos

é muito questionada por outros autores (94;114) pois impediria a análise morfológica e sua correlação com a expressão da galectina-3. Além disso, deve-se ressaltar que a galectina-3 é expressada naturalmente por histiócitos e células endoteliais, o que acarretaria em aumento dos níveis dessa molécula quando utilizadas metodologias como o *Western blotting* ou PCR(115) mesmo em tireóides normais pois esses métodos não conseguem discernir qual população celular está expressando a molécula. Portanto é crucial o uso de ensaios que identifiquem a localização da expressão na célula ou no tecido, como é o caso da imunohistoquímica/imunocitoquímica e a hibridização “in situ” (100).

3. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo testar a expressão da galectina-3 como um marcador de malignidade, em secções histológicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS DE TECIDOS

Foi realizado um estudo retrospectivo com 90 casos de tireoidectomia estocados no Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília e no Núcleo de Citopatologia e Anatomia Patológica do Hospital de Base do Distrito Federal. Esses casos foram operados para tratamento independente do presente estudo. O material estudado foi processado conforme a rotina do estudo histopatológico: fixação com formol e processado com inclusão em parafina. Foram selecionados no total, 15 casos de bócio adenomatoso, 24 de adenoma folicular, 29 de carcinoma papilar e 22 de carcinoma folicular. Em 50 casos foi possível avaliar também o parênquima tireoidiano normal encontrado na adjacência do tumor.

Essa amostra foi obtida de maneira seqüencial, sem qualquer pré-seleção, e ocorreu de acordo com a disponibilidade dos blocos de parafina. Alguns casos, por exemplo, não estavam disponíveis por diversos fatores, entre eles a retirada prévia dos blocos pelo paciente, ou devido às más condições técnicas dos blocos que não permitiam a realização do procedimento de imunohistoquímica.

Em posse dos blocos de parafina, foram realizadas secções histológicas coradas em H.E. para revisão do diagnóstico e seleção dos blocos para imunohistoquímica. Essa seleção foi guiada pelos critérios de adequabilidade (condições técnicas como fixação) e

representatividade da lesão a ser estudada. A reação de imunohistoquímica foi feita em pelo menos 2 blocos por caso, para se testar a focalidade da reação.

Foram registrados a idade e o sexo do paciente para cada caso a fim de se comparar os dados epidemiológicos da amostra com os de cada enfermidade. Outras informações clínicas (por exemplo sintomas e níveis hormonais), não estavam disponíveis.

IMUNOHISTOQUÍMICA

O estudo imunohistoquímico foi realizado em secções de tecido, obtidos a partir dos blocos selecionados, com a finalidade de se pesquisar a expressão da galectina-3, utilizando o protocolo da Estreptovidina Peroxidase.

As amostras selecionadas foram submetidas à microtomia obtendo-se secções de tecido na espessura de 3 micrômetros que foram colocados em lâminas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e silanizadas em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical CO., StLouis, MO/USA).

Os procedimentos para a reação de imunohistoquímica são detalhados a seguir:

1 - Hidratação das lâminas: A desparafinização das secções de tecido foi realizada em três banhos de substituto vegetal de xilol [Eco-k ®], na estufa a 37°C. A seguir, as secções foram hidratadas em quatro banhos de álcool (álcool absoluto, álcool a 95%, 90% e 80%).

2 - Bloqueio da peroxidase endógena: Foram realizados três banhos de 10 minutos cada com água oxigenada a 3%.

3 – Pré-tratamento das lâminas: O próximo passo em uma bateria usual de imunohistoquímica seria a recuperação antigênica com calor. No entanto, essa etapa foi omitida no sentido de se evitar falsos positivos por reação cruzada com elementos constitutivos das células tireoidianas (comunicação pessoal com o Dr. Venâncio A. F. Alves – FMUSP).

4 – Reagente Primário: As lâminas foram distribuídas sobre espumas de borracha, umedecidas com água, que foram acondicionadas em cubas plásticas dotadas de tampas. Cada lâmina foi lavada com TBS e secada. A seguir foram gotejados sobre elas os reagentes primários, anticorpos anti-galectina-3, clone 9C4 (Novocastra Laboratories) previamente diluídos em 1:500. A reação teve a duração de uma noite (*over night*), a 4°C.

5 - Reagente Secundário (Kit Dako K-0690-LSAB+®): Cada lâmina foi lavada com TBS e secada. A seguir foram gotejadas sobre elas o Reagente Secundário. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente.

6 - Reagente Streptoavidina peroxidase (Kit Dako K-0690-LSAB+®): Cada lâmina foi lavada com TBS. A seguir foram gotejadas sobre elas o Reagente Streptoavidina peroxidase. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente.

7 - Solução de DAB líquido (Kit K-3466 Dako ®): Todas as lâminas foram lavadas com TBS, a seguir foi gotejada a Solução DAB. As lâminas foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente.

8 - Hematoxilina: As lâminas foram retiradas das bandejas e colocadas em cuba de coloração para serem lavadas em água corrente. A seguir foram coradas pelo método de Hematoxilina de Harris, durante 20 segundos. Em seguida as lâminas foram lavadas, rapidamente, em água amoniacal e, depois, em água corrente.

9 - Montagem das lâminas: Para finalizar, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e as secções de tecido foram recobertas com lamínulas de vidro, utilizando-se para isso resina sintética – Entellan ®.

ANÁLISE DA REAÇÃO AO MICROSCÓPIO ÓPTICO

Utilizando-se os procedimentos descritos acima, têm-se uma reação positiva quando existe depósito de material acastanhado (produto depositado da reação de peroxidase). Foi feita uma graduação semi-quantitativa da reação, com avaliação da Intensidade de Reação no Citoplasma (IRC), a Distribuição da Reação pelo Tumor (DRT) e a presença de Reação Nuclear (RN).

A Intensidade de Reação no Citoplasma foi graduada em: (+) fraca, (++) moderada e (+++) forte. Já a Distribuição da Reação pelo Tumor foi graduada de acordo com a proporção da área do tumor que se mostrou positiva, sendo que (+) representa menos de 25%; (++) entre 25 e 50%; (+++) entre 50 e 75%; (+++++) mais de 75% do tumor. Com isso é possível graduar a intensidade da reação bem como se ela é focal ou difusa.

A Reação Nuclear foi avaliada se presente ou não, sem quantificação. Foi pesquisado ainda se os folículos linfóides, bem como as células foliculares adjacentes a

esses folículos eram positivos. Em 50 casos o parênquima tireoidiano normal, adjacente à tumoração, foi também examinado e classificado em positivo ou negativo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se comprovar a validade da galectina-3 no diagnóstico de malignidade de tumores da glândula tireóide, é necessária a comparação dos resultados obtidos na reação com um teste definido como padrão ouro, o diagnóstico histopatológico. Este é considerado um método inquestionável para a definição do comportamento biológico do nódulo. Através dessa comparação pode-se calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia diagnóstica, “Likelihood Ratio” Positiva e “Likelihood Ratio” Negativa da reação para o diagnóstico de malignidade nos tumores estudados. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa BioEstat 5.0.

A sensibilidade é definida como a probabilidade de se a reação for positiva, o caso estudado ser câncer, ou seja, mostra a capacidade da galectina-3 em selecionar os casos malignos. A especificidade é entendida como a probabilidade de sendo o teste negativo, o tumor ser benigno, em outras palavras, é a propriedade da reação estudada excluir os casos benignos. O valor preditivo positivo é definido como a probabilidade pós teste de um caso positivo ser câncer e valor preditivo negativo é a probabilidade pós teste de um caso negativo ser benigno. Acurácia diagnóstica é a proporção de todos os testes realizados terem resultados corretos (compatíveis com o padrão ouro). A “Likelihood Ratio” Positiva representa a razão da probabilidade (chance) de o caso ser maligno quando a reação é positiva. E a “Likelihood Ratio” Negativa é a razão da probabilidade do caso ser maligno quando o teste for negativo (116).

O valor preditivo positivo e negativo, assim como a acurácia diagnóstica são dependentes da prevalência da doença na amostra estudada. Por isso também foram calculados esses valores utilizando-se uma prevalência de 5%, que corresponde à proporção de câncer em nódulos de tireóide(56;57).

A metodologia proposta é classificada como retrospectiva, pois se baseou no resultado do teste padrão-ouro (o estudo histopatológico), para se selecionar os casos e então realizar o ensaio.

5. RESULTADOS

A **TABELA 1** mostra a proporção do sexo feminino e a média da idade para os casos de bócio adenomatoso, adenoma folicular, carcinoma papilar e carcinoma folicular obtidos a partir da amostra levantada.

TABELA 1. Descrição da amostra comparando a proporção de indivíduos do sexo feminino e a média de idade para os casos estudados.

	n	Sexo(F:M)	Idade
Bócio Adenomatoso	15	14:1	43,8 (±15,5)
Adenoma Folicular	24	11:1	43,5 (±15,3)
Carcinoma Papilar	29	8,6:1	44,1 (±15,2)
Carcinoma Folicular	22	4,2:1	43,8 (±16,2)

A **Tabela 2** resume os achados da análise da expressão da galectina-3 nos tecidos estudados. Não foi verificada imunomarcagem em nenhum dos casos de tireóide normal. Dos 15 casos de bócio adenomatoso, apenas um demonstrou positividade citoplasmática com expressão fraca IRC (+) e focal DRT (+) (Figura 1D); 5 casos tiveram positividade nuclear.

TABELA 2. Semi-quantificação da Intensidade de Reação no Citoplasma (IRC), Distribuição da Reação pelo Tumor (DRT) e presença de Reação Nuclear (RN).

	n	Reação Citoplasmática		IRC*			DRT**				RN***
		Negativa	Positiva	+	++	+++	+	++	+++	++++	Positivo
Tireóide Normal	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bócio Adenomatoso	15	14	1	1	0	0	1	0	0	0	5
Adenoma Folicular	24	20	4	2	2	0	3	1	0	0	4
Carcinoma Folicular	22	4	18	1	11	6	1	1	4	12	17
Carcinoma Papilar	29	0	29	0	7	22	1	1	7	20	14

*IRC Intensidade de Reação no Citoplasma: (+) Fraca; (++) Moderada; (+++) Forte

**DRT Distribuição da Reação pelo Tumor: (+) Menos de 25%; (++) Entre 25 e 50%; (+++) Entre 50 e 75%; (++++) Mais de 75% do tumor

***RN Reação Nuclear

Quatro casos dos vinte e quatro de adenoma folicular tiveram imunomarcagem no citoplasma (Figura 2A), com intensidades variando de fraca a média IRC (+) ou (++) , com expressão focal DRT (+) ou (++) .

Em relação ao carcinoma folicular, mais de 81% da amostra teve o citoplasma positivo para a reação (Figura 1A), com maior quantidade de casos tendo IRC de (++) e DRT de (++++). Dezesete casos foram positivos na marcação nuclear. Quatro casos não tiveram marcação citoplasmática.

Todos os casos estudados de carcinoma papilar foram positivos para a galectina-3, tendo reações citoplasmáticas classificadas em sua maioria como fortes IRC (++++) e difusas DRT (++++) (Figura 1B e 1C). Destes, seis eram da variante folicular.

Foi verificada ainda a expressão da galectina-3 por macrófagos (nos centros germinativos e no interior de folículos), células endoteliais, e até mesmo por células foliculares não neoplásicas dispostas no interior e ao redor de folículos linfóides (Figura 2B, 2C e 2D).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia diagnóstica para a reatividade citoplasmática (**Tabela 3**) foram, respectivamente, 92,16%, 94,38%, 90,38%, 95,45% e 93,57%. A prevalência de casos positivos(malignos) foi de 36%. Os valores para a “Likelihood Ratio” Positiva e a “Likelihood Ratio” Negativa foram 16,40 e 0,08 respectivamente. Após a correção para prevalência de 5% o valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia diagnóstica corresponderam a 46,33%, 99,56% e 94,27%

TABELA 3 Valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia diagnóstica, “Likelihood Ratio” Positiva, “Likelihood Ratio” Negativa para reatividade citoplasmática da galectina-3 no diagnóstico de malignidade de tumores de tireóide, de acordo com a prevalência da amostra (36%) e após correção para prevalência de 5%.

	Prevalência de 36% (amostra)	Correção para prevalência de 5%
Sensibilidade	92,16%	
Especificidade	94,38%	
Valor Preditivo Positivo	90,38%	46,33%
Valor Preditivo Negativo	95,45%	99,56%
Acurácia	93,57%	94,27%
“Likelihood Ratio” Positiva	16,40	
“Likelihood Ratio” Negativa	0,08	

Houve 5 casos falso-positivos (Erro Tipo I=5,62%), sendo um caso referente a bócio e 4 casos de adenoma folicular. Foi verificado ainda 4 casos de falso-negativos (Erro Tipo II=7,84%), todos envolvendo amostras de carcinoma folicular.

A **Tabela 4** apresenta os dados referentes à imunomarcção nuclear para a galectina-3. Os valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia diagnóstica foram menores que os encontrados para a reação citoplasmática, correspondendo respectivamente a 60,78%, 89,89%, 77,50%, 80,00% e 79,29%. Os valores para “Likelihood Ratio” Positiva e “Likelihood Ratio” Negativa foram de 6,01 e 0,44 respectivamente.

TABELA 4 Valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia diagnóstica, “Likelihood Ratio” Positiva, “Likelihood Ratio” Negativa para reatividade nuclear da galectina-3 no diagnóstico de malignidade de tumores de tireóide.

Sensibilidade	60,78%
Especificidade	89,89%
Valor Preditivo Positivo	77,50%
Valor Preditivo Negativo	80,00%
Acurácia	79,29%
“Likelihood Ratio” Positiva	6,01
“Likelihood Ratio” Negativa	0,44

6. DISCUSSÃO

A presente dissertação relata um estudo experimental que testou a expressão da galectina-3, por células foliculares, como um marcador diagnóstico de malignidade em tumores da tireóide. Para isso, a imunomarcagem dessa molécula foi pesquisada em produtos de tireoidectomia e confrontada com o exame histopatológico (padrão ouro).

A amostra do presente estudo teve a distribuição de idade e sexo compatível com as relatadas na literatura. Essas doenças são mais prevalentes em mulheres e em indivíduos adultos - na 5ª e 6ª décadas de vida(13). O carcinoma folicular é o tipo histológico que apresenta a menor relação entre indivíduos do sexo feminino e masculino(13), conforme foi observado. Desta forma, a amostra estudada pode ser considerada representativa das doenças listadas.

Entre os casos de carcinoma, a expressão citoplasmática da galectina-3 foi mais freqüente para o carcinoma papilar, sendo todos os casos positivos, enquanto que para o carcinoma folicular, 19% da amostra não apresentou imunomarcagem. Essa maior freqüência da expressão da galectina-3 nos casos de carcinoma papilar já foi descrita por outros trabalhos (6;95;96;117). É interessante notar que na presente amostra de 29 casos não houve falso-negativos, e existem relatos da sua ocorrência com freqüência variando de 7% a 16% (6;76;103). Na maior amostra estudada, em 201 casos, 195 (97%) foram positivos (6). Esse quadro sugere que uma via oncogênica envolvendo a expressão da galectina-3 é freqüentemente ativada nos casos de carcinoma papilar. Entretanto apesar do fato desses dados serem, em primeira análise, animadores esbarram em dificuldades quando se pretende extrapolar sua aplicação para a citopatologia. Ora, o carcinoma papilar é o tipo histológico mais facilmente caracterizado pelo exame citopatológico, em virtude das suas características nucleares

peculiares (17;18). Então a aplicação de um procedimento complementar para a triagem de um caso maligno teria pouca importância se presentes critérios morfológicos suficientes para o diagnóstico de carcinoma papilar.

O ideal, para a aplicação deste teste em produtos de PAAF, seria que a expressão da galectina-3 tivesse uma forte relação com o carcinoma folicular, pois faltam critérios citopatológicos para o seu diagnóstico. Além disso, foi verificado que em 2 casos de carcinoma folicular e 2 casos de carcinoma papilar, a expressão esteve restrita a menos de 50% da área tumoral (DRT + ou ++). Esse fato deve ser ressaltado uma vez que uma amostragem pouco representativa de um caso de carcinoma papilar ou carcinoma folicular pode ser negativa, mesmo em casos verdadeiramente positivos, devido à focalidade da expressão da galectina-3. Essa ressalva já havia sido feita anteriormente (100;109;118) e deverá ser considerada na avaliação de um caso individual.

Quatro dos 24 adenomas foliculares foram falso-positivos. Bartolazzi e cols., em 2001, levantaram a hipótese de que os adenomas foliculares com expressão da galectina-3 são na verdade representados por células malignamente transformadas, nas quais a invasão capsular e/ou vascular ainda não ocorreu (6). Ou seja, essas lesões corresponderiam a uma neoplasia maligna em estágio inicial, ou a uma lesão potencialmente maligna. Essa afirmação necessita de melhor investigação prospectiva. Os dados do presente estudo não ajudam na elucidação desta hipótese.

Outro caso falso positivo foi de bócio adenomatoso o qual apresentou expressão citoplasmática fraca e focal. Com tantas evidências sobre a implicação da galectina-3 no ciclo celular e na progressão maligna, fica difícil defender a expressão dessa molécula, que denota um fenótipo maligno, em uma alteração hiperplásica como é o caso do bócio. Por isso é mais plausível aceitar que houve um resultado falso-positivo por viés no teste empregado. O meio de revelação disponível para a reação foi da estreptoavidina, que utiliza anticorpos secundários biotinilados. Alguns trabalhos utilizaram meios livres de biotina (107;119;120) para reduzir as reações não específicas. Os meios de revelação que utilizam anticorpos secundários conjugados à biotina podem revelar uma atividade endógena, constitucional, e não a reação específica (reconhecimento do anticorpo anti-galectina-3 e seu antígeno). Ou seja, o que é revelado é uma reação de fundo e não uma reação específica. Esse viés, além de ocorrer na tireóide, é comum em outros tecidos como o fígado. Dessa forma alguns autores advogam que para se garantir menor proporção de reações cruzadas, deve-se utilizar meios livres de biotina ou outros procedimentos para seu bloqueio (99;100;114;115).

Durante a bateria realizada, foi feita tentativa de não ativar a atividade biotina endógena evitando-se o passo da reativação antigênica. No entanto, esse procedimento pode não ter sido satisfatório nesse caso, acarretando na reação inespecífica.

Foi evidenciada expressão da galectina-3 por macrófagos, endotélio e também por células foliculares normais localizadas dentro ou ao redor de folículos linfóides. Sabe-se que algumas células e tecidos, entre eles macrófagos e endotélio, expressam constitucionalmente a galectina-3(79). Outros pesquisadores já haviam observado que células foliculares aprisionadas em, ou ao redor de, folículos linfóides expressam a galectina-3 de forma inesperada (95;96;110;117;118;121). Nessas áreas de inflamação crônica, suspeita-se que ocorra uma neossíntese da molécula induzida por citocinas secretadas pelas células inflamatórias, ou simplesmente uma permeabilidade da galectina-3 dos linfócitos e macrófagos para as células foliculares vizinhas (121;122). Esse fenômeno pode trazer sérias repercussões para a aplicação desse teste em materiais citopatológicos, pois um grupo celular positivo para a expressão da galectina-3 pode ser decorrente não da progressão neoplásica, mas dessa alteração induzida pelo processo inflamatório crônico.

A expressão nuclear da galectina-3 se mostrou menos sensível e específica do que a citoplasmática, e com base nisso não deverá ser considerada numa possível aplicação. Outros autores já haviam notado até mesmo que algumas condições fisiológicas das células foliculares estão associadas à reação nuclear (77;114).

Quando analisada toda a amostra, a sensibilidade e especificidade da expressão citoplasmática da galectina-3 para o diagnóstico de malignidade foi de 92,16% e 94,38%, respectivamente. O valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram, respectivamente, 90,38% e 95,45%. Em uma comparação, esses valores são superiores aos observados por Cap e colaboradores, quando avaliaram a capacidade da citopatologia em indicar corretamente o procedimento cirúrgico (64). Esses pesquisadores observaram sensibilidade de 86% e especificidade de 74%, valor preditivo positivo de 34% e valor preditivo negativo de 97%, além de acurácia diagnóstica de 75%. Porém, após a correção da prevalência de doença para 5%, o valor preditivo positivo caiu para 46,33%, enquanto o valor preditivo negativo e a acurácia diagnóstica foi de 99,56% e 94,27%, respectivamente.

Os casos falso-positivos observados na presente amostra tiveram grande peso para o baixo valor preditivo positivo observado, após as correções para a prevalência de 5%. Dos cinco casos observados, um provavelmente foi decorrente de artefato técnico

como já relatado acima. Os demais corresponderam a casos de adenoma folicular. Deve-se estar atento para o fato de que alguns adenomas foliculares expressarem a galectina-3, quando uma decisão cirúrgica depender desse teste. No entanto, mesmo após a correção da prevalência o valor da acurácia diagnóstica manteve-se alto.

Em trabalhos que estudam testes diagnósticos, valores do “Likelihood Ratio” Positivo maior que 10 e do “Likelihood Ratio” Negativo menor que 0,10 são definidos como referência para se considerar que o teste estudado é clinicamente relevante (123). Foram calculados os valores de 16,40 e 0,08 para o “Likelihood Ratio” Positivo e “Likelihood Ratio” Negativo. Ou seja, na presente amostra, a expressão citoplasmática da galectina-3 representa um risco 16,40 vezes maior de a neoplasia ser maligna. Portanto têm-se uma demonstração estatística do forte potencial deste marcador para a seleção de neoplasias malignas.

Não existem testes diagnósticos perfeitos, sem resultados falso-positivos ou falso-negativos. Desta maneira, ao interpretar o resultado de um ensaio, o médico se depara com a incerteza sobre o estado da doença de seu paciente (o resultado do teste assegura ou afasta a doença pesquisada?). E quando se trata de pesquisa para câncer, as decisões diagnósticas erradas podem ter conseqüências desastrosas para o paciente pois com muita freqüência o tratamento oncológico ou é uma cirurgia radical ou envolve radio e quimioterapia. Assim sendo, é mister saber com que freqüência ocorrem os erros em determinado teste (123) e além disso, qual o poder que o teste tem em selecionar os casos em que a doença está presente e excluir os casos nos quais não há doença.

Para facilitar o entendimento dos estudos sobre testes diagnósticos, foi publicado uma iniciativa chamada de STARD, sigla em inglês para *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy* (124). Esse grupo delimitou algumas condições que os estudos sobre testes diagnósticos devem satisfazer para serem considerados confiáveis e aplicáveis na prática clínica. Essas premissas foram ressaltadas para estudos com a galectina-3 em tumores tireoidianos (73) e são: (1) desenho prospectivo do estudo; (2) o estudo deverá examinar uma população clinicamente relevante, com indivíduos portadores da doença na mesma proporção que eles se encontram na população em geral. E também deverão ser avaliados os casos em que o resultado citopatológico não se enquadra em maligno ou benigno (“proliferações foliculares”) para se saber a real aplicação deste procedimento em um momento de decisão diagnóstica; (3) presença de um exame padrão-ouro, no caso o exame histopatológico do nódulo; (4) a interpretação do teste e do padrão ouro deve ser independente e cega – essa premissa será melhor

satisfeita se o desenho do estudo for prospectivo; (5) quantificação da concordância inter e intraobservador; (6) estratificação do resultado positivo.

Considerando essas condições o presente trabalho não teve um desenho prospectivo uma vez que partiu do diagnóstico histopatológico, para a realização do teste e ainda a extrapolação dos resultados para materiais citopatológicos. O desenho retrospectivo pode ter violado a premissa do resultado do teste ter sido independente e cego. A amostra foi levantada por conveniência, de acordo com a disponibilidade dos blocos de parafina. O ideal seria ter-se à disposição os casos que foram classificados como “proliferação folicular” ao exame citopatológico. A escolha do exame padrão-ouro (histopatológico) é inquestionável na literatura. Não foi realizada uma comparação da concordância inter e intraobservador.

Portanto a metodologia executada no presente estudo não preencheu todos os critérios do STARD. Porém a virtude dos resultados apresentados foi acrescentar dados à literatura e descrever as situações em que eventuais falso-positivos e falso-negativos podem ocorrer. Os resultados obtidos estão em consonância com os demais publicados no sentido de apontar a expressão da galectina-3 por tumores tireoidianos como um forte indício de um comportamento biológico maligno.

A aplicação da galectina-3 na histopatologia e citopatologia da tireóide poderá, diante das evidências atuais, melhorar o diagnóstico das lesões tireoidianas. Em espécimes cirúrgicos, sua alta sensibilidade e especificidade (6), ajudará na definição da natureza maligna de nódulos encapsulados de padrão folicular, com núcleos suspeitos para carcinoma papilar (por exemplo diagnóstico diferencial entre adenoma folicular e a variante folicular do carcinoma papilar). E também ajudará na distinção entre adenoma folicular e carcinoma folicular minimamente invasivo (105). Além disso servirá de auxílio na distinção entre cistos malignos de cistos hemorrágicos no contexto de bócio (100).

Em material obtido por PAAF, quer sejam esfregaços ou *cell blocks*, a expressão da galectina-3 por células foliculares pode constituir um elemento molecular para identificação dessas células como malignas, que demanda tratamento cirúrgico. Diante de esfregaços com elementos císticos, a imunomarcagem com a galectina-3 mostrou maior sensibilidade do que os critérios citopatológicos, no reconhecimento de células malignas (carcinoma papilar cístico contendo raras células epiteliais no fluido aspirado) (104). No caso de resultados negativos, deve-se ressaltar que alguns materiais

correspondentes a carcinomas expressam a molécula de forma focal (100;109), portanto aumentando os riscos para um resultado falso negativo, devido a viés de amostragem.

Apesar de ter alta especificidade e sensibilidade, a expressão da galectina-3 não pode ser demonstrada em alguns casos da maneira esperada, ou como nos casos de adenoma folicular ela é observada sem a lesão ser maligna. Portanto a pesquisa por outros marcadores para serem utilizados em conjunto com a galectina-3 poderá aumentar a acurácia diagnóstica. O produto da fusão do gene PAX8-PPARgamma foi demonstrado estar presente em núcleos de carcinoma folicular e não em adenomas (125). Porém esses resultados não foram reproduzidos e a especificidade deste marcador pode ser baixa(100). Outra linha de pesquisa é a investigação da HBME-1 (um marcador de células mesoteliais) e isoformas da enzima peroxidase da tireóide (TPO) que são superexpressados em tumores malignos tireoidianos. A acurácia destes marcadores também foi demonstrada em espécimes de PAAF(126). Uma vez que nenhuma destas moléculas é 100% específica e sensível, é mais razoável propor que um painel de marcadores irá fornecer os maiores índices de acurácia diagnóstica em materiais de PAAF (126;127).

Esses testes moleculares devem ser encarados como complementares ao estudo citopatológico e não uma substituição. E por esse motivo ensaios como a imunocitoquímica devem ser preferidos pois possibilitam no mesmo material uma análise morfológica e imunofenotípica (114). Entretanto a aplicação desses procedimentos na prática clínica aguarda resultados de estudos prospectivos, com grandes amostras que satisfaçam os critérios do STARD.

7. CONCLUSÃO

A imunomarcção citoplasmática pela galectina-3 se comportou como um marcador de malignidade em tumores de tireóide com nítida preferência de expressão para os casos malignos. Casos falso-positivos foram observados em adenomas foliculares e bócio adenomatoso. Casos falso-negativos foram observados em carcinomas foliculares. Foi observado ainda a expressão da molécula por células foliculares normais situadas em microambientes de inflamação crônica.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia diagnóstica, “Likelihood Ratio” Positiva e “Likelihood Ratio” Negativa foram respectivamente de 92,16%, 94,38%, 90,38%, 95,45%, 93,57%, 16,40 e 0,08. Após a correção para prevalência de 5%, o valor preditivo positivo, valor preditivo

negativo e acurácia diagnóstica passaram a ser 46,33%, 99,56% e 94,27%, respectivamente. Esses dados sugerem que a pesquisa pela expressão da galectina-3 poderá ajudar na distinção de um nódulo maligno e benigno.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Gimm O. Thyroid cancer. *Cancer Letters* 2001 Feb 26;163(2):143-56.
- (2) Governo do Distrito Federal. Câncer no DF: Tendências de Mortalidade 1979-1998 e incidência 1996-1998. 2001.
- (3) Amrikachi M, Ramzy I, Rubinfeld S, Wheeler TM. Accuracy of fine-needle aspiration of thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 2001 Apr;125(4):484-8.
- (4) Sclabas GM, Staerckel GA, Shapiro SE, Fornage BD, Sherman SI, Vassilopoulos-Sellin R, et al. Fine-needle aspiration of the thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *Am J Surg* 2003 Dec;186(6):702-9.
- (5) Carpi A, Nicolini A, Gross MD, Fig LM, Shapiro B, Fanti S, et al. Controversies in diagnostic approaches to the indeterminate follicular thyroid nodule. *Biomed Pharmacother* 2005 Oct;59(9):517-20.
- (6) Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001 May 26;357(9269):1644-50.
- (7) DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004.
- (8) Harach HR, Escalante DA, Onativia A, Lederer OJ, Saravia DE, Williams ED. Thyroid carcinoma and thyroiditis in an endemic goitre region before and after iodine prophylaxis. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985 Jan;108(1):55-60.
- (9) Tronko MD, Bogdanova TI, Komissarenko IV, Epstein OV, Oliynyk V, Kovalenko A, et al. Thyroid carcinoma in children and adolescents in Ukraine after the Chernobyl nuclear accident: statistical data and clinicomorphologic characteristics. *Cancer* 1999 Jul 1;86(1):149-56.
- (10) Antonelli A, Miccoli P, Derzhitski VE, Panasiuk G, Solovieva N, Baschieri L. Epidemiologic and clinical evaluation of thyroid cancer in children from the Gomel region (Belarus). *World J Surg* 1996 Sep;20(7):867-71.
- (11) Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, Hayashi T, Mizuno T, Tsuyama N, et al. In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res* 1993 Jul 1;53(13):2940-3.

- (12) LiVolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL. Papillary Carcinoma. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editors. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004. p. 57-66.
- (13) Thompson LD. Malignant Neoplasms of the Thyroid Gland. In: Thompson LDR, editor. *Endocrine Pathology*. 1st ed. Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 77-144.
- (14) Chan JK. Papillary carcinoma of thyroid: classical and variants. *Histol Histopathol* 1990 Apr;5(2):241-57.
- (15) Kaur A, Jayaram G. Thyroid tumors: cytomorphology of papillary carcinoma. *Diagn Cytopathol* 1991;7(5):462-8.
- (16) Soderstrom N, Biorklund A. Intranuclear cytoplasmic inclusions in some types of thyroid cancer. *Acta Cytol* 1973 May;17(3):191-7.
- (17) Kini SR. Thyroid. In: Kline TS, editor. *Guides to Clinical Aspiration Biopsy*. 2nd ed. New York, NY: Igaku-Shoin Medical Publishers; 1996. p. 176-88.
- (18) Kini SR, Miller JM, Hamburger JI, Smith MJ. Cytopathology of papillary carcinoma of the thyroid by fine needle aspiration. *Acta Cytol* 1980 Nov;24(6):511-21.
- (19) Miller TR, Bottles K, Holly EA, Friend NF, Abele JS. A step-wise logistic regression analysis of papillary carcinoma of the thyroid. *Acta Cytol* 1986 May;30(3):285-93.
- (20) Sanchez MA, Stahl RE. The Thyroid, Parathyroid, and Neck Masses Other Than Lymph Nodes. In: Koss LG, Melamed MR, editors. *Koss' Diagnostic Cytology And Its Histologic Bases*. 5th ed. New York: Igaku Shoin; 2006. p. 1148-85.
- (21) Naganuma H, Murayama H, Ohtani N, Takaya K, Mori Y, Sakai N, et al. Optically clear nuclei in papillary carcinoma of the thyroid: demonstration of one of the fixation artifacts and its practical usefulness. *Pathol Int* 2000 Feb;50(2):113-8.
- (22) Francis IM, Das DK, Sheikh ZA, Sharma PN, Gupta SK. Role of nuclear grooves in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. A quantitative assessment on fine needle aspiration smears. *Acta Cytol* 1995 May;39(3):409-15.
- (23) Bhambhani S, Kashyap V, Das DK. Nuclear grooves. Valuable diagnostic feature in May-Grunwald-Giemsa-stained fine needle aspirates of papillary carcinoma of the thyroid. *Acta Cytol* 1990 Nov;34(6):809-12.
- (24) Fiorella RM, Isley W, Miller LK, Kragel PJ. Multinodular goiter of the thyroid mimicking malignancy: diagnostic pitfalls in fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol* 1993;9(3):351-5.

- (25) Riazmontazer N, Bedayat G. Psammoma bodies in fine needle aspirates from thyroids containing nontoxic hyperplastic nodular goiters. *Acta Cytol* 1991 Sep;35(5):563-6.
- (26) Akerman M, Tennvall J, Biorklund A, Martensson H, Moller T. Sensitivity and specificity of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of tumors of the thyroid gland. *Acta Cytol* 1985 Sep;29(5):850-5.
- (27) Muller N, Cooperberg PL, Suen KC, Thorson SC. Needle aspiration biopsy in cystic papillary carcinoma of the thyroid. *AJR Am J Roentgenol* 1985 Feb;144(2):251-3.
- (28) Hsu C, Boey J. Diagnostic pitfalls in the fine needle aspiration of thyroid nodules. A study of 555 cases in Chinese patients. *Acta Cytol* 1987 Nov;31(6):699-704.
- (29) Mazzaferri EL, Young RL. Papillary thyroid carcinoma: a 10 year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients. *Am J Med* 1981 Mar;70(3):511-8.
- (30) Holzer S, Reiners C, Mann K, Bamberg M, Rothmund M, Dudeck J, et al. Patterns of care for patients with primary differentiated carcinoma of the thyroid gland treated in Germany during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Group. *Cancer* 2000 Jul 1;89(1):192-201.
- (31) Osmolski A, Frenkiel Z, Osmolski R. Complications in surgical treatment of thyroid diseases. *Otolaryngol Pol* 2006;60(2):165-70.
- (32) Falvo L, Giacomelli L, D'Andrea V, Marzullo A, Guerriero G, de AE. Prognostic importance of sclerosing variant in papillary thyroid carcinoma. *Am Surg* 2006 May;72(5):438-44.
- (33) Ghossein RA, Leboeuf R, Patel KN, Rivera M, Katabi N, Carlson DL, et al. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma without extrathyroid extension: biologic behavior and clinical implications. *Thyroid* 2007 Jul;17(7):655-61.
- (34) Sobrinho Simões M, Asa SL, Kroll TG. Follicular Carcinoma. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editors. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004. p. 67-72.
- (35) Chan JK. Tumors of the Thyroid and Parathyroid Glands. In: Fletcher CDM, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 2nd ed. Churchill Livingstone; 2003. p. 959-1056.
- (36) Grebe SK, Hay ID. Follicular thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995 Dec;24(4):761-801.
- (37) Baloch ZW, LiVolsi VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol* 2002 Jan;117(1):143-50.

- (38) D'Avanzo A, Treseler P, Ituarte PH, Wong M, Streja L, Greenspan FS, et al. Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis. *Cancer* 2004 Mar 15;100(6):1123-9.
- (39) Franssila KO, Ackerman LV, Brown CL, Hedinger CE. Follicular carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 1985 May;2(2):101-22.
- (40) Baloch ZW, Sack MJ, Yu GH, LiVolsi VA, Gupta PK. Fine-needle aspiration of thyroid: an institutional experience. *Thyroid* 1998 Jul;8(7):565-9.
- (41) Caraway NP, Sneige N, Samaan NA. Diagnostic pitfalls in thyroid fine-needle aspiration: a review of 394 cases. *Diagn Cytopathol* 1993;9(3):345-50.
- (42) Tuttle RM, Lemar H, Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid* 1998 May;8(5):377-83.
- (43) Schlinkert RT, van Heerden JA, Goellner JR, Gharib H, Smith SL, Rosales RF, et al. Factors that predict malignant thyroid lesions when fine-needle aspiration is "suspicious for follicular neoplasm". *Mayo Clin Proc* 1997 Oct;72(10):913-6.
- (44) Yang GC, Liebeskind D, Messina AV. Should cytopathologists stop reporting follicular neoplasms on fine-needle aspiration of the thyroid? *Cancer* 2003 Apr 25;99(2):69-74.
- (45) Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002 Jan;26(1):41-4.
- (46) Tyler DS, Winchester DJ, Caraway NP, Hickey RC, Evans DB. Indeterminate fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: identification of subgroups at high risk for invasive carcinoma. *Surgery* 1994 Dec;116(6):1054-60.
- (47) Palme CE, Waseem Z, Raza SN, Eski S, Walfish P, Freeman JL. Management and outcome of recurrent well-differentiated thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004 Jul;130(7):819-24.
- (48) Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see commets]. *Cancer* 1998 Dec 15;83(12):2638-48.
- (49) Tan RK, Finley RK, III, Driscoll D, Bakamjian V, Hicks WL, Jr., Shedd DP. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a 24-year experience. *Head Neck* 1995 Jan;17(1):41-7.
- (50) Carcangiu ML, Steeper T, Zampi G, Rosai J. Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. *Am J Clin Pathol* 1985 Feb;83(2):135-58.
- (51) Guarda LA, Peterson CE, Hall W, Baskin HJ. Anaplastic thyroid carcinoma: cytomorphology and clinical implications of fine-needle aspiration. *Diagn Cytopathol* 1991;7(1):63-7.

- (52) Geisinger KR, Stanley MW, Raab SS, Silverman JF, Abati A. Thyroid Gland Fine Needle Aspiration. In: Geisinger KR, Stanley MW, Raab SS, Silverman JF, Abati A, editors. *Modern Cytopathology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004. p. 731-80.
- (53) Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000 Mar 1;88(5):1139-48.
- (54) Mortensen JD, Woolner LB, Bennett WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1955 Oct;15(10):1270-80.
- (55) Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 1994 Aug 22;154(16):1838-40.
- (56) Mazzaferri EL, de los Santos ET, Rofagha-Keyhani S. Solitary thyroid nodule: diagnosis and management. *Med Clin North Am* 1988 Sep;72(5):1177-211.
- (57) Rojeski MT, Gharib H. Nodular thyroid disease. Evaluation and management. *N Engl J Med* 1985 Aug 15;313(7):428-36.
- (58) Castro MR, Gharib H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med* 2005 Jun 7;142(11):926-31.
- (59) Koss LG, Woyke S, Olszewski W. *Aspiration Biopsy. Cytologic Interpretation and Histologic Bases*. 2nd ed. New York: Igaku-Shoin; 1992.
- (60) Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993 Feb 15;118(4):282-9.
- (61) Hamberger B, Gharib H, Melton LJ, III, Goellner JR, Zinsmeister AR. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Impact on thyroid practice and cost of care. *Am J Med* 1982 Sep;73(3):381-4.
- (62) Gutman PD, Henry M. Fine needle aspiration cytology of the thyroid. *Clin Lab Med* 1998 Sep;18(3):461-82, vi.
- (63) Jogai S, Al-Jassar A, Temmim L, Dey P, Adesina AO, Amanguno HG. Fine needle aspiration cytology of the thyroid: a cytohistologic study with evaluation of discordant cases. *Acta Cytol* 2005 Sep;49(5):483-8.
- (64) Cap J, Ryska A, Rehorkova P, Hovorkova E, Kerekes Z, Pohnetalova D. Sensitivity and specificity of the fine needle aspiration biopsy of the thyroid: clinical point of view. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999 Oct;51(4):509-15.
- (65) Finley DJ, Zhu B, Barden CB, Fahey TJ, III. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Ann Surg* 2004 Sep;240(3):425-36.

- (66) Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, et al. Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer* 2000 Dec 25;90(6):335-41.
- (67) Ko HM, Jhu IK, Yang SH, Lee JH, Nam JH, Juhng SW, et al. Clinicopathologic analysis of fine needle aspiration cytology of the thyroid. A review of 1,613 cases and correlation with histopathologic diagnoses. *Acta Cytol* 2003 Sep;47(5):727-32.
- (68) Yang J, Schnadig V, Logrono R, Wasserman PG. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. *Cancer* 2007 Oct 25;111(5):306-15.
- (69) La Rosa GL, Belfiore A, Giuffrida D, Sicurella C, Ippolito O, Russo G, et al. Evaluation of the fine needle aspiration biopsy in the preoperative selection of cold thyroid nodules. *Cancer* 1991 Apr 15;67(8):2137-41.
- (70) Carpi A, Nicolini A, Sagripanti A, Menchini FF, Righi C, Romani R, et al. Large-needle aspiration biopsy for the preoperative selection of follicular adenoma diagnosed by fine-needle aspiration as a microfollicular nodule or suspected cancer. *Am J Clin Oncol* 2002 Apr;25(2):209-12.
- (71) Carpi A, Nicolini A, Righi C, Romani R, Di CG. Large needle aspiration biopsy results of palpable thyroid nodules diagnosed by fine-needle aspiration as a microfollicular nodule with atypical cells or suspected cancer. *Biomed Pharmacother* 2004 Jul;58(6-7):351-5.
- (72) Gasbarri A, Marchetti C, Iervasi G, Bottoni A, Nicolini A, Bartolazzi A, et al. From the bench to the bedside. Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid nodules. *Biomed Pharmacother* 2004 Jul;58(6-7):356-9.
- (73) Sanabria A, Carvalho AL, Piana dA, V, Pablo RJ, Vartanian JG, Rinaldo A, et al. Is galectin-3 a good method for the detection of malignancy in patients with thyroid nodules and a cytologic diagnosis of "follicular neoplasm"? A critical appraisal of the evidence. *Head Neck* 2007 Nov;29(11):1046-54.
- (74) Natali PG, Mottolese M, Ventura I. Improvement of cytodagnosis of solid tumors using a panel of monoclonal antibodies. In: Divieri F, Puppo F, Sudelletti M, editors. *Biological response modifiers Application in clinical medicine*. Bologna: Esculapio; 1990. p. 314-23.
- (75) Rosai J. Immunohistochemical markers of thyroid tumors: significance and diagnostic applications. *Tumori* 2003 Sep;89(5):517-9.
- (76) Gasbarri A, Martegani MP, Del PF, Lucante T, Natali PG, Bartolazzi A. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol* 1999 Nov;17(11):3494-502.
- (77) Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998 Jul 15;58(14):3015-20.

- (78) Rodrigo JP, Rinaldo A, Devaney KO, Shaha AR, Ferlito A. Molecular diagnostic methods in the diagnosis and follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma. *Head Neck* 2006 Nov;28(11):1032-9.
- (79) Califice S, Castronovo V, Van Den BF. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol* 2004 Oct;25(4):983-92.
- (80) Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982 Mar;128(3):1221-8.
- (81) Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, et al. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J Biol Chem* 1993 Dec 15;268(35):26704-11.
- (82) Maquoi E, van den Brule FA, Castronovo V, Foidart JM. Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts. *Placenta* 1997 Jul;18(5-6):433-9.
- (83) Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994 Aug;269(33):20807-10.
- (84) Inohara H, Raz A. Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer Res* 1995 Aug 1;55(15):3267-71.
- (85) Inohara H, Akahani S, Koths K, Raz A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res* 1996 Oct 1;56(19):4530-4.
- (86) Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 25;93(13):6737-42.
- (87) Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 1997 Dec 1;57(23):5272-6.
- (88) Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 14;92(4):1213-7.
- (89) Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry* 1993 Aug 3;32(30):7644-9.
- (90) Raz A, Zhu DG, Hogan V, Shah N, Raz T, Karkash R, et al. Evidence for the role of 34-kDa galactoside-binding lectin in transformation and metastasis. *Int J Cancer* 1990 Nov 15;46(5):871-7.

- (91) Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, et al. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001 Apr;18(4):787-92.
- (92) Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, et al. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett* 2003 May 30;195(1):111-9.
- (93) Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2003 Feb;60(2):267-76.
- (94) Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995 Sep;147(3):815-22.
- (95) Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, et al. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol* 1997 Jan;181(1):80-6.
- (96) Cvejic D, Savin S, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Sinadinovic J. Immunohistochemical localization of galectin-3 in malignant and benign human thyroid tissue. *Anticancer Res* 1998 Jul;18(4A):2637-41.
- (97) Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, et al. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999 Jun 1;85(11):2475-84.
- (98) Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, et al. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol* 2000 Apr;31(4):428-33.
- (99) Herrmann ME, LiVolsi VA, Pasha TL, Roberts SA, Wojcik EM, Baloch ZW. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2002 Jun;126(6):710-3.
- (100) Volante M, Bozzalla-Cassione F, Orlandi F, Papotti M. Diagnostic role of galectin-3 in follicular thyroid tumors. *Virchows Arch* 2004 Apr;444(4):309-12.
- (101) Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la CA, Kloos RT. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 2005 Jan;18(1):48-57.
- (102) de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira FF, Assumpcao LV, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology* 2005 Oct;47(4):391-401.
- (103) Beesley MF, McLaren KM. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology* 2002 Sep;41(3):236-43.

- (104) Papotti M, Volante M, Saggiorato E, Deandreis D, Veltri A, Orlandi F. Role of galectin-3 immunodetection in the cytological diagnosis of thyroid cystic papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2002 Oct;147(4):515-21.
- (105) Saggiorato E, Cappia S, De GP, Mussa A, Pancani G, Caraci P, et al. Galectin-3 as a presurgical immunocyto-diagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Nov;86(11):5152-8.
- (106) Savin SB, Cvejic DS, Jankovic MM. Expression of galectin-1 and galectin-3 in human fetal thyroid gland. *J Histochem Cytochem* 2003 Apr;51(4):479-83.
- (107) Collet JF, Hurbain I, Prengel C, Utzmann O, Scetbon F, Bernaudin JF, et al. Galectin-3 immunodetection in follicular thyroid neoplasms: a prospective study on fine-needle aspiration samples. *Br J Cancer* 2005 Nov 14;93(10):1175-81.
- (108) Rossi ED, Raffaelli M, Minimo C, Mule A, Lombardi CP, Vecchio FM, et al. Immunocytochemical evaluation of thyroid neoplasms on thin-layer smears from fine-needle aspiration biopsies. *Cancer* 2005 Apr 25;105(2):87-95.
- (109) Park YJ, Kwak SH, Kim DC, Kim H, Choe G, Park dJ, et al. Diagnostic value of galectin-3, HBME-1, cytokeratin 19, high molecular weight cytokeratin, cyclin D1 and p27(kip1) in the differential diagnosis of thyroid nodules. *J Korean Med Sci* 2007 Aug;22(4):621-8.
- (110) Niedziela M, Maceluch J, Korman E. Galectin-3 is not an universal marker of malignancy in thyroid nodular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Sep;87(9):4411-5.
- (111) Bernet VJ, Anderson J, Vaishnav Y, Solomon B, Adair CF, Saji M, et al. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic Acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Oct;87(10):4792-6.
- (112) Martins L, Matsuo SE, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CU, Kimura ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Oct;87(10):4806-10.
- (113) Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R, Johnson SJ, Wilson JA, Davies BR, et al. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 2004 Nov;45(5):493-500.
- (114) Bartolazzi A, Papotti M, Orlandi F. Methodological considerations regarding the use of galectin-3 expression analysis in preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Feb;88(2):950-1.
- (115) Bartolazzi A, Bussolati G. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 2006 Jan;48(2):212-3.
- (116) Greenhalgh T. How to read a paper. Papers that report diagnostic or screening tests. *BMJ* 1997 Aug 30;315(7107):540-3.

- (117) Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology* 2002 Jan;40(1):80-7.
- (118) Gaffney RL, Carney JA, Sebo TJ, Erickson LA, Volante M, Papotti M, et al. Galectin-3 expression in hyalinizing trabecular tumors of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 2003 Apr;27(4):494-8.
- (119) Saggiorato E, Aversa S, Deandreis D, Arecco F, Mussa A, Puligheddu B, et al. Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas. *J Endocrinol Invest* 2004 Apr;27(4):311-7.
- (120) Kim MJ, Kim HJ, Hong SJ, Shong YK, Gong G. Diagnostic utility of galectin-3 in aspirates of thyroid follicular lesions. *Acta Cytol* 2006 Jan;50(1):28-34.
- (121) Kovacs RB, Foldes J, Winkler G, Bodo M, Sapi Z. The investigation of galectin-3 in diseases of the thyroid gland. *Eur J Endocrinol* 2003 Nov;149(5):449-53.
- (122) Rabinovich GA, Rubinstein N. [Galectins: a novel family of proteins involved in the regulation of the immune response. Implications in immunopathological processes]. *Medicina (B Aires)* 2001;61(1):85-92.
- (123) Giard RW, Hermans J. The diagnostic information of tests for the detection of cancer: the usefulness of the likelihood ratio concept. *Eur J Cancer* 1996 Nov;32A(12):2042-8.
- (124) Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *BMJ* 2003 Jan 4;326(7379):41-4.
- (125) Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000 Aug 25;289(5483):1357-60.
- (126) Raphael SJ. The meanings of markers: ancillary techniques in diagnosis of thyroid neoplasia. *Endocr Pathol* 2002;13(4):301-11.
- (127) Baloch ZW, LiVolsi VA. The quest for a magic tumor marker: continuing saga in the diagnosis of the follicular lesions of thyroid. *Am J Clin Pathol* 2002 Aug;118(2):165-6.

ANEXO I

Tabela com descrição por caso da origem do material, identificação, sexo, idade, diagnóstico histopatológico, intensidade de reação citoplasmática, distribuição da reação pelo tumor e presença de reação nuclear.

Número do Caso	Sexo	Idade	Diagnóstico Histopatológico	IRC	DRT	RN
1	M	29	Carcinoma Folicular	++	++++	+
2	F	40	Adenoma Folicular	0	0	+
4	M	38	Adenoma Folicular	0	0	0
7	F	37	Adenoma Folicular	0	0	0
8	F	49	Carcinoma Papilar	++	++++	+
9	F	36	Carcinoma Folicular	0	0	0
10	F	40	Carcinoma Folicular	++	++++	+
11	F	48	Carcinoma Folicular	0	0	0
12	F	40	Carcinoma Folicular	+++	++++	+
13	F	27	Adenoma Folicular	+	+	+
23	F	62	Carcinoma Folicular	++	++++	+
24	F	35	Adenoma Folicular	0	0	0
25	F	71	Adenoma Folicular	0	0	0
26	M		Carcinoma Folicular	+++	++++	+
27	F	37	Carcinoma Papilar	++	++++	0
28	M	61	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
29	F	38	Adenoma Folicular	0	0	0
30	F	20	Carcinoma Folicular	++	++	0
32	F	25	Adenoma Folicular	0	0	0
34			Carcinoma Folicular	+++	++++	+
35	F	36	Carcinoma Folicular	++	++++	+
36	M	60	Carcinoma Folicular	++	+++	+
37	F	36	Adenoma Folicular	0	0	0
38	F	30	Adenoma Folicular	0	0	0
39	F	24	Adenoma Folicular	0	0	0
40	F	77	Adenoma Folicular	0	0	0
41	F		Adenoma Folicular	0	0	0
42	F	27	Adenoma Folicular	0	0	0
43	F	24	Carcinoma Folicular	++	++++	+
44	F		Adenoma Folicular	+	+	0
45			Carcinoma Folicular	+++	++++	+
46	F	40	Adenoma Folicular	0	0	+
47	F	22	Carcinoma Folicular	++	+++	+
48			Adenoma Folicular	0	0	0
49	F	45	Carcinoma Folicular	++	+++	+
50	F	48	Carcinoma Folicular	++	++++	+
51	F	78	Carcinoma Folicular	+++	++++	+
52	F	37	Adenoma Folicular	0	0	0
53	F		Carcinoma Folicular	0	0	0
54	F	60	Carcinoma Folicular	++	++++	+
55	F		Adenoma Folicular	++	+	0
57	M	54	Carcinoma Folicular	+++	+++	+
58			Adenoma Folicular	0	0	0
59	M		Adenoma Folicular	0	0	0

60	F	58	Carcinoma Folicular	0	0	+
61	F	57	Carcinoma Papilar	+++	+	+
62	F	31	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
63	M		Carcinoma Papilar	+++	++++	0
64	F	52	Bócio Adenomatoso	0	0	0
65	F	32	Carcinoma Papilar	++	++	+
66	F	49	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
67	F	38	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
68	F	58	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
69	F	39	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
70	F	30	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
71	F	36	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
72	F	36	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
73	F		Carcinoma Papilar	++	+++	0
75	F	30	Bócio Adenomatoso	+	+	+
76	F	25	Adenoma Folicular	0	0	0
77	F	34	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
78	F	54	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
79	F	38	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
80	F	21	Carcinoma Papilar	++	+++	+
81	F	60	Bócio Adenomatoso	0	0	0
82	F	37	Adenoma Folicular	++	++	+
83	F	71	Bócio Adenomatoso	0	0	0
84	F	21	Carcinoma Papilar	+++	+++	0
85	F	48	Bócio Adenomatoso	0	0	0
86	F	55	Carcinoma Papilar	++	+++	0
87	M	66	Bócio Adenomatoso	0	0	+
88	F	64	Bócio Adenomatoso	0	0	0
89	F	33	Bócio Adenomatoso	0	0	0
90	F	60	Carcinoma Papilar	++	+++	0
91	F	36	Bócio Adenomatoso	0	0	+
92	M	-	Carcinoma Papilar	+++	++++	0
93	F	47	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
94	F	48	Bócio Adenomatoso	0	0	0
95	F	23	Bócio Adenomatoso	0	0	0
96	F	45	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
97	F	61	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
98	F	49	Bócio Adenomatoso	0	0	+
99	F	50	Bócio Adenomatoso	0	0	0
100			Carcinoma Folicular	+	+	0
101	F	21	Carcinoma Papilar	+++	+++	0
102	F	48	Adenoma Folicular	0	0	0
103	F	29	Carcinoma Papilar	+++	++++	+
104	F	20	Bócio Adenomatoso	0	0	+
105	F	51	Bócio Adenomatoso	0	0	0
106	F		Carcinoma Papilar	+++	+++	+

ANEXO II

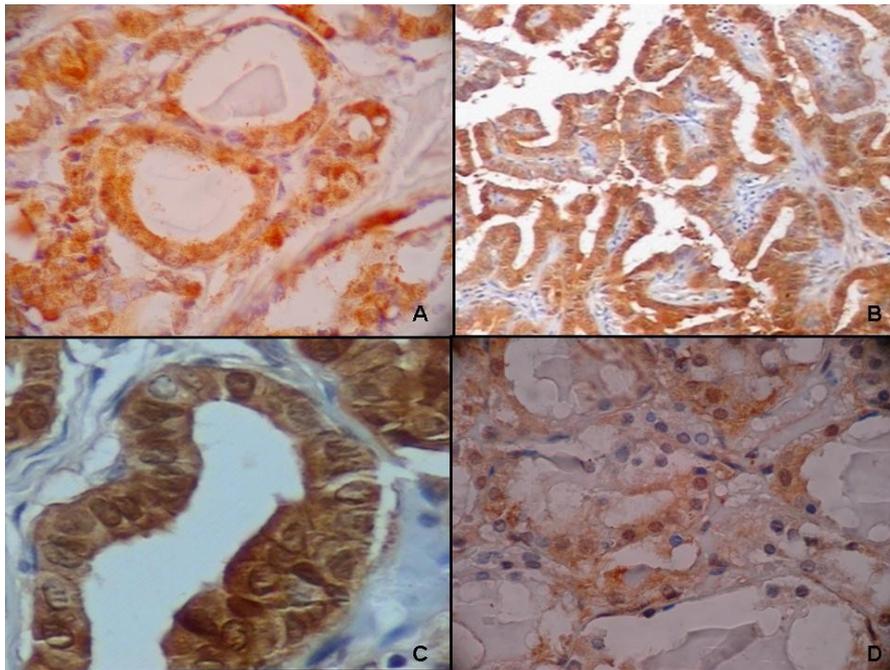


FIGURA 1 Imunomarcção com a galectina-3. (A) Carcinoma folicular [IRC ++ ; DRT +++++] aumento de 100X. (B) Carcinoma papilar [IRC +++ ; DRT +++++] aumento de 100X. (C) Carcinoma papilar [IRC ++ ; DRT +++++] aumento de 400X. (D) Bócio Adenomatoso [IRC + ; DRT +] aumento de 400X.

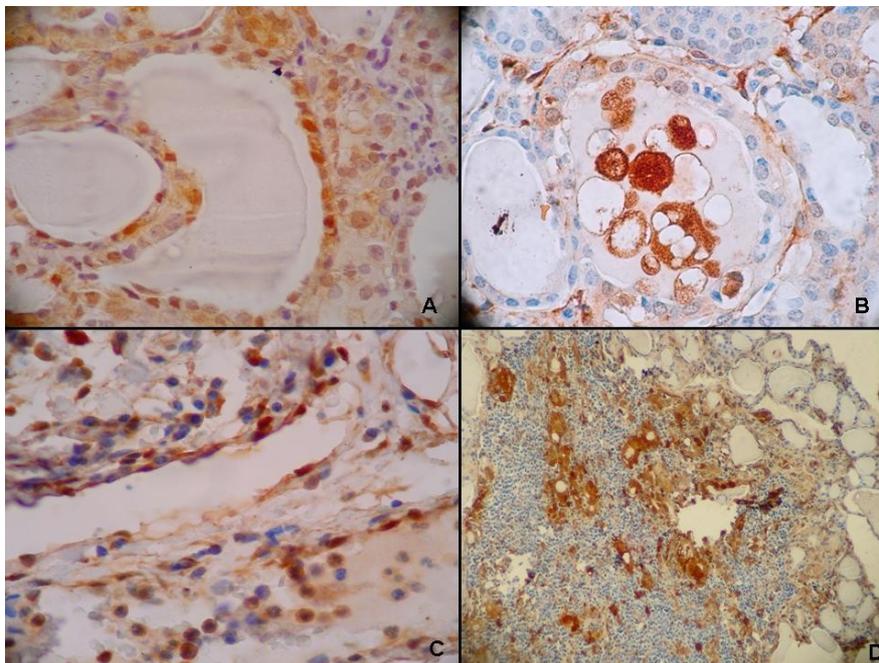


FIGURA 2 Imunomarcção com a galectina-3. (A) Adenoma Folicular [IRC + ; DRT +] aumento de 100X. (B) Macrófagos intrafoliculares. Aumento de 100X. (C) Endotélio. Aumento de 400X. (D) Células foliculares normais dentro de foliculos linfóides com imunomarcção para galectina-3. Aumento de 100X.