

RESUMO

A apoptose é um processo de morte celular que ocorre geralmente após a fragmentação progressiva do DNA e parece ser importante em tecidos normais e neoplásicos. Pouco é conhecido sobre a ocorrência da apoptose nas doenças da tireóide. A finalidade deste estudo é investigar um possível papel da apoptose no crescimento do carcinoma bem diferenciado de tireóide, usando um ensaio com nucleotidil transferase in situ (ENTIS), o qual detecta a fragmentação do DNA, para determinar a frequência da apoptose no bócio colóide (BC), adenoma folicular (AF), carcinoma folicular (CF) e carcinoma papilar (CP). Os tecidos de BC (n=3), AF (n=2), CF (n=4) e CP (n=3) foram obtidos de ressecção cirúrgica em 12 pacientes. As células apoptóticas positivas (CAP) dentro do folículo tireoidiano e tecido neoplásico foram contadas em áreas de 1cm². O teste T foi utilizado para testar a significância estatística. O número de CAPs foi significativamente maior ($p < 0,0001$) nos BC e AF ($24,4 \pm 8,2$ CAP/cm²) comparado com CF e CP ($1,33 \pm 0,82$ CAP/cm²). Nenhuma diferença significativa foi vista no número de CAPs entre BC e AF e entre CF e CP. A apoptose pode desempenhar um importante papel na progressão do carcinoma bem diferenciado de tireóide, visto que no presente estudo o índice apoptótico foi muito baixo nessas neoplasias. A apoptose, diferentemente da necrose, é um processo ativo que poderia ser inibido ou induzido o que, neste caso, seria interessante para a terapêutica. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2000;44/2: 153-6)

*Marcus A. Lima
Jacqueline F. Rios
Lília B. Oliveira
Danielle P.C. Rita
Marta E.A. Araújo
Maria F. Borges*

Unitermos: Apoptose; Tireóide; Hiperplasia; Neoplasia; Tiroidopatias.

ABSTRACT

Apoptosis is a process by which cell death occurs after progressive fragmentation of DNA and that seems to be important in normal and neoplastic tissues. Little is known about the role of apoptosis in the thyroid disease. The aim of this study is to investigate a possible role of apoptosis in growth of well-differentiated carcinoma of thyroid using an in situ nucleotidyl transferase assay (ISNTA), which detects DNA fragmentation, to determine the frequency of apoptosis in nodular goiter (NG), follicular adenoma (FA), follicular carcinoma (FC) and papillary carcinoma (PC). Surgical resection specimens were obtained from 12 patients including NG (n=3), FA (n=2), FC (n=4) and PC (n=3). Positive apoptotic cells (PAC) within the thyroid follicle and neoplastic tissue were counted per section of 1cm². Unpaired t test was utilized to test for statistical significance. The number of PACs were significantly greater ($p < 0,0001$) in NG and FA ($24,4 \pm 8,2$ PAC/cm²) than in FC and PC ($1,33 \pm 0,82$ PAC/cm²). No significant difference was found in the number of PACs between NG and FA and between FC and PC. Apoptosis may play an important role in progression of well-differentiated carcinoma of thyroid gland. This study showed that inhibition of the apoptosis might be implicated in development of the carcinomas of thyroid, considering that the apoptotic index was low in these tumors. Apoptosis, differently from the necrosis, is an active process that could be inhibited or induced, which might have

*Disciplina de Endocrinologia da
Faculdade de Medicina do Triângulo
Mineiro (FMTM), Uberaba, MG.*

*Recebido em 01/03/1999
Revisado em 28/06/1999 e 21/10/1999
Aceito em 20/12/1999*

interesting implications for therapy. (Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/2: 153-6)

Keywords: Apoptosis; Thyroid; Hyperplasia; Neoplasia; Thyroid disease.

A MORTE CELULAR PROGRAMADA foi observada há 40 anos e, inicialmente, foi chamada de necrose de redução. Este tipo de morte celular é complementar à mitose na regulação da proliferação celular animal, e, em virtude do seu importante papel cinético, este fenômeno recebeu, em 1971, o nome de "Apoptosis" (1). A apoptose é um tipo de morte celular que se diferencia da necrose por fatores bioquímicos e ultra-estruturais e é caracterizada pela redução no tamanho da célula, condensação da cromatina, geralmente com fragmentação do núcleo e do DNA e perda da integridade da membrana plasmática, podendo acontecer em processos normais e patológicos (2). Ocorre nos sistemas imune (2,3), nervoso (4) e anormalidades nos seus níveis desencadeiam doenças: a sua inibição gera hiperplasia ou auto-imunidade, enquanto a exacerbação, ocasiona doenças degenerativas (5).

A transformação tecidual reflete um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Sendo assim, a perda da apoptose, por si só, é relevante na carcinogênese e a sua perfeita compreensão, bem como a de seus mecanismos reguladores, permitiria o estabelecimento de uma terapêutica tumoral mais eficiente (6,7).

Tem sido observado que os carcinomas bem diferenciados de tireóide, papilífero e folicular, mostram taxas de crescimento extremamente baixas, em relação a carcinoma de mesmo grau histológico que ocorre em outros órgãos, tais como mama, pulmão, cólon e estômago (8,9). Questiona-se o modo pelo qual estes tumores de tireóide crescem, e já foi proposta a hipótese de que a inibição da apoptose estivesse implicada no desenvolvimento destas neoplasias; entretanto, os estudos sobre a expressão de bcl-2, proteína inibidora de apoptose, em neoplasias de tireóide (10) não mostraram diferenças significativas em comparação com tecidos tireoidianos não-neoplásicos e normais (11,12). Estes achados sugerem que bcl-2 não deve ter um papel importante na patologia dessas lesões.

Em vista do exposto, pretende-se buscar outros dados que auxiliem no esclarecimento do(s) mecanismo(s) de progressão das neoplasias malignas bem diferenciadas de tireóide, comparando a apoptose, que ocorre nestas neoplasias, com aquela detectada nas tireoidopatias benignas.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de casos

Foram examinadas 3 tireóides hiperplásicas (bócios colóides - BC) e 9 neoplásicas [2 adenomas foliculares (AF), 4 carcinomas foliculares (CF) e 3 carcinomas papilíferos (CP)] obtidas de tireoidectomias.

Os diagnósticos das tireoidopatias não neoplásicas fundamentaram-se na morfologia histológica clássica e os diagnósticos das neoplasias foram feitos de acordo com os critérios histológicos de Hedinger et al. (13) e modificados por Rosai et al. (14).

Ética médica

O estudo está de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revista em 1983.

Marcação de DNA em células apoptóticas

Com o objetivo de detectar células apoptóticas, utilizou-se a marcação *in situ* da extremidade 3' de fragmentos de DNA originados por endonucleases associadas à apoptose. A marcação da extremidade 3' do DNA foi realizada utilizando o marcador para detecção da apoptose *in situ* ApopTag (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), como previamente descrito (15).

Técnica do ApopTag

Os tecidos tireoidianos obtidos pela tireoidectomia foram fixados em formalina, embebidos em parafina e cortados a uma espessura de 4µm. Foram amostrados, em média, seis cortes de tecido por glândula. Os cortes foram desparafinizados em xilol por cinco minutos, lavados em dois banhos de cinco minutos de etanol absoluto, hidratados em álcool a 95% e 70% por três minutos e colocados em solução tampão tris (TBS) 0,05M pH7,5 por cinco minutos. Posteriormente, os espécimes foram incubados em proteinase k a 200µg/ml durante 40 minutos a 25°C. Em seguida, foram lavados quatro vezes em água destilada, incubados em H₂O₂ a 2%, por cinco minutos, a 25°C e colocados em solução de tampão de salina fosfato (PBS) 0,1M pH 7,4 por duas vezes de cinco minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em tampão de equilíbrio por 20 minutos; em seguida, foi colocada solução da enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) sobre as lâminas que foram recobertas com plástico transparente, para melhor distensão da solução. Após incubação de uma hora, a 37°C, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem e de parada súbita da reação por dez minutos a 25°C. Os cortes foram passados três vezes de quinze minutos por solução de PBS e depois incubados em 55µl de anti-

digoxigenin peroxidase (S7101-5) durante 30 minutos a 25°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas quatro vezes de cinco minutos com PBS e colocadas em 125ml de solução de hidrócloro de diaminobenzidina por três a seis minutos e depois lavadas em água destilada por três vezes de um minuto. Em seguida, os cortes foram contracolorados com verde de metila a 0,05% durante dez minutos, lavados em água destilada, passados três vezes de 30 segundos por butanol a 100% e montados com xilol e entelan.

Finalmente, fez-se a análise das lâminas por três observadores relatando o índice apoptótico.

Índice Apoptótico

As células foram definidas como apoptóticas se toda a área nuclear da célula fosse positiva e houvesse corpos apoptóticos como corpos globulares pequenos, isoladamente ou em grupos, positivos nos citoplasmas das células.

O índice apoptótico foi definido como a soma das células apoptóticas e que continham corpos apoptóticos, o que reflete o número total de eventos apoptóticos em uma determinada área de 1cm². Foram analisados cinco campos de 1cm² por glândula. Foi também contado o número total de células para medir a densidade celular.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação entre tiroidopatias benignas (BC+AF) e malignas (CF+CP), utilizou-se o teste T. Considerou-se o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Expressão de apoptose em tiroidopatias benignas

Foram analisadas 3 tiróides hiperplásicas, com bócio colóide, e a expressão de apoptose ocorreu nas 3 tiróides estudadas, variando de 18 a 25 células/cm², e nos 2 casos de adenomas foliculares a positividade variou de 18 a 38 células/cm², com densidade celular de 12000 a 15000 células/campo.

Expressão de apoptose em tiroidopatias malignas

Em relação aos carcinomas papilares, havia apoptose em 2 dos 3 casos analisados, sendo a expressão rara e observada apenas em 1 a 2 células/cm², com densidade celular de 12000 a 15000 células foliculares/campo.

Da mesma forma, nos carcinomas foliculares, a expressão foi escassa e ocorreu em 1 a 2 células/cm².

A comparação entre as tiroidopatias benignas e malignas mostrou diferença extremamente significativa, sendo $P < 0,0001$. Os resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Índice apoptótico em tiroidopatias benignas e malignas (células apoptóticas/cm²).

Diagnóstico	Índice apoptótico em 13.500 células/cm ²			
	N	Média	Desvio padrão	Varição
Adenoma folicular	2	28	14,1	18 - 38
Bócio nodular	3	22	3,6	18 - 35
Carcinoma folicular	4	1,3	0,5	01 - 02
Carcinoma papilar	3	1,0	1,0	00 - 02

DISCUSSÃO

Nós pretendemos buscar dados que auxiliem no esclarecimento do(s) mecanismo(s) de progressão das neoplasias malignas bem diferenciadas de tiróide, comparando a apoptose, que ocorre nestas neoplasias, com aquelas detectadas nas tiroidopatias benignas.

Nos adenomas foliculares e hiperplasias da tiróide, a expressão de apoptose foi elevada, e isto sugere que a morte celular programada ocorre, nestes casos, de modo mais intenso, aumentando a homeostase tissular, uma vez que ambas as doenças são benignas. Não há relatos na literatura sobre os índices apoptóticos em tiróides normais. Porém, sabe-se que a apoptose tem sido observada, ocasionalmente, em secções histológicas de tiróide normal (16), e este processo é anormalmente acelerado durante as fases de maior atividade da Tiroidite de Hashimoto (17).

Uma molécula chamada Fas, encontrada na superfície celular, é uma das chaves no processo de morte celular programada (18). Células tiroidianas normais não sofrem apoptose porque expressam quantidade insignificante de Fas (18-20).

Em relação aos 7 carcinomas bem diferenciados de tiróide, folicular e papilífero, ambos apresentaram número muito baixo de células apoptóticas, havendo uma diferença de expressão de apoptose entre as tiroidopatias benignas e malignas extremamente significativa.

A comparação da apoptose entre as tiroidopatias benignas e malignas sugere que a inibição da apoptose deve estar implicada no desenvolvimento dos carcinomas bem diferenciados de tiróide, visto que o índice apoptótico foi muito baixo nestas neoplasias e a diminuição da apoptose, por si só, é relevante na carcinogênese (15). Isso é importante porque a apoptose, diferentemente da necrose, é um processo ativo que, a princípio, pode ser inibido ou induzido, o que, nestes casos, seria interessante para a terapêutica (21).

Quanto à apoptose relacionada à carcinogênese, há relatos de que alterações genéticas cumulativas em oncogenes e genes supressores de tumor estão envolvi-

das na gênese tumoral. O comportamento desses tumores é dependente da cooperação e antagonismo de vários genes associados também envolvidos na apoptose como p53, bcl-2, c-myc, Fas-Apo-1, MDR-1, MDR-2, entre outros (15). As concentrações relativas das várias proteínas codificadas por estes genes determinam o destino da célula (22).

O presente estudo mostra que a falta de predisposição dos carcinomas bem diferenciados de tireóide em sofrer apoptose poderia explicar a irresponsividade destas neoplasias à radio e quimioterapia. A tendência em sofrer apoptose está provavelmente na dependência da relação das proteínas bax e bcl-2. Em trabalho anterior (12), já demonstramos uma elevada incidência da imunopositividade para a proteína bcl-2 em carcinomas bem diferenciados de tireóide e estas alterações em bcl-2 aumentam a sobrevivência celular, permitindo a expansão e evolução oncogênica.

A carcinogênese é um processo evolutivo complexo, facilitado por aumento da instabilidade genética. Consequentemente, o comportamento dos tumores é dependente da cooperação e antagonismo dos vários genes associados. Um conhecimento mais profundo a respeito da interação destes genes na regulação da apoptose promoverá uma abordagem mais eficaz e racional das neoplasias humanas (15).

REFERÊNCIAS

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972;26:239-57.
2. Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Krammer PH. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. **J Cell Biol** 1994;127:15-20.
3. Chandler D, El-Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ. Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. **Hum Pathol** 1994;25:789-96.
4. Robertson LE, Plunkett W. Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma** 1993;11:71-4.
5. Meyn RE, Milas L, Stephen C. Programmed cell death in normal development and disease. **Cancer Bull** 1994;46:120-4.
6. Di Vinci A, Geido E, Infusini E, Giaretti W. Neuroblastoma cell apoptosis induced by the synthetic retinoid n-(4-hydroxyphenyl) retinamide. **Int J Cancer** 1994;59:422-6.
7. Schulte-Hermann R, Bursch W, Grasl-Kraupp B, Török L, Ellinger A, Müllauer L. Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. **Toxicol Lett** 1995;82/83:143-8.
8. Katoh R, Bray CE, Suzuki K, Komiyama A, Hemmi A, Kawaol, et al. Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. **Hum Pathol** 1995;26:139-46.
9. Lima MA, Gontijo VA, Schmitt FCL. CD26 (dipeptidyl aminopeptidase IV) expression in normal and disease human thyroid glands. **Endocr Pathol** 1998;9:43-52.
10. Manetto V, Lorenzini R, Cordon-Cardo C, Krajewski S, Rosai J, Reed JC, et al. Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumors. An immunohistochemical and western blot analysis. **Virchows Arch** 1997;430:125-30.
11. Branet F, Caron P, Camallières M, Selves J, Brousset P. Bcl-2 proto-oncogene expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. **Bull Cancer** 1996;83:213-7.
12. Lima MA, Gontijo VA. Expressão da proteína bcl-2 em tireóides normais e tireoidopatias. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1998;42(3):229-34.
13. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. **Histological Typing of Thyroid Tumors**. WHO International Histological Classification of Tumors. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1998.
14. Rosai J, Carcangiu ML, De Lellis RA. **Atlas of Tumor Pathology**. Tumors of the thyroid gland. Washington: Armed Institute of Pathology, fasc. 5, 1992.
15. Delfino AB, Barreto EC, Silva Jr ET, Mendonça RG, Ornelas MH. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose - Carcinogênese. **Rev Bras Cancerol** 1997;43(3):173-86.
16. Dremier S, Golstein J, Mosselmans R, Dumont JE, Galand P, Robaye B. Apoptosis in dog thyroid cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1994;200(1):52-8.
17. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's Thyroiditis. **Autoimmunity** 1995;20(4):231-6.
18. Williams N. Thyroid Disease: A case of cell suicide? **Science** 1997;275:926.
19. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. **Science** 1997;275:960-3.
20. Baker JR Jr. Dying (apoptosing?) for a consensus on the Fas death pathway in the thyroid. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84(8):2593-5.
21. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. **Circulation** 1997;95(2):320-3.
22. Kernohan NM, Cox LS. Regulation of apoptosis by bcl-2 and its related proteins: immunochemical challenges and therapeutic implications. **J Pathol** 1996;179:1-3.

Endereço para correspondência:

Marcus Aurelio de Lima
Disciplina de Endocrinologia - Hospital Escola
Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
Rua Getúlio Guaritá, 130
38025-440 Uberaba, MG
Fax: (034) 312-6640
e-mail: lima@mednet.com.br