

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

LESEMKY CARLILE HERCULANO CATTEBEKE

**A EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MARCADOR
MOLECULAR CITOQUERATINA 19 E DA PROTEÍNA HER-2/NEU
(C-erbB2) EM TIREOIDES OPERADAS NA FUNDAÇÃO HOSPITAL
ADRIANO JORGE, NO AMAZONAS.**

**Manaus
2012**

LESEMKY CARLILE HERCULANO CATTEBEKE

**A EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MARCADOR MOLECULAR
CITOQUERATINA 19 E DA PROTEÍNA HER-2/NEU (C-erbB2) EM TIREOIDES
OPERADAS NA FUNDAÇÃO HOSPITAL ADRIANO JORGE, NO AMAZONAS.**

Tese apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
do Amazonas como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia, área de concentração
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. LD João Bosco Lopes Botelho

Coorientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi-Filho

Coorientadora: Prof.^a Dra. Beatrix Barry

Coorientadora: Prof.^a Dra. Maria Amélia Duarte Ferreira

Manaus
2012

Ficha Catalográfica elaborada pelo Departamento de Arquivologia e Biblioteconomia da UFAM

Cattebeke, Lesemky Carlile Herculano.

C368 A expressão imuno-histoquímica do marcador molecular Citoqueratina 19 e da proteína Her-2/neu (C-erbB2) em bócios operados na Fundação Hospital

Adriano Jorge, em Manaus - AM./

Lesemky Carlile Herculano Cattebeke. – Manaus: Ufam, 2012.

66f.: Il.

Orientador: João Bosco Lopes Botelho, LD

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Tireoide 2. Imuno-histoquímica 3. Citoqueratina 19. I. Título

LESEMKY CARLILE HERCULANO CATTEBEKE

**A EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MARCADOR MOLECULAR
CITOQUERATINA 19 E DA PROTEÍNA HER-2/NEU (C-erbB2) EM TIREOIDES
OPERADAS NA FUNDAÇÃO HOSPITAL ADRIANO JORGE, NO AMAZONAS.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovado em 12 de Janeiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. LD João Bosco Lopes Botelho – Orientador
Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dr. Cláudio do Carmo Chaves
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Fernando Luiz Westphal
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Marcel Heibel
Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dr. Walter Ricardo Brito
Universidade do Estado do Amazonas

DEDICATÓRIA

Obrigado, ó **Deus** Pai, pela jornada e as ferramentas...

A **Ti** toda honra e toda glória...

À **Lissandra** com amor e carinho,

A **João Lucas** e **Gabriela**, maior feito e orgulho.

Aos meus pais Dr. **Arnaldo** Centurion Cattebeke e **Maria Ete** Herculano Cattebeke,

e irmãs **Luciana** e **Tatiana**, por me ensinarem a persistir.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Orientador JOÃO BOSCO LOPES BOTELHO, Doutor e Livre Docente, Professor da Disciplina Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial e História da Medicina da UEA, Professor Titular Aposentado da UFAM, Membro da Sociedade Francesa de Otorrinolaringologia e SBORL-CCF, Professor Convidado de Faculdades Francesas, Titular da Academia Amazonense de Medicina, pela Orientação e pelo Pioneirismo nesta e outras tantas iniciativas acadêmicas nestas Universidades, exemplo vivo de que o bom médico nunca deve parar de estudar.

Ao Prof. Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO, por seu entusiasmo e espírito científico desbravador, pela confiança que ainda faremos muitos trabalhos juntos, neste novo caminho que escolhemos descobrir.

À Prof^a. Dra. BEATRIX BARRY, que aceitou participar desta empreitada como co-orientadora, preservando o legado deixado pelo saudoso Prof. PIERRE GEHANNO, que foi o intercâmbio entre estudantes amazonenses e franceses.

À Prof^a. Dra. MARIA AMÉLIA DUARTE FERREIRA, que se dispôs a coorientar esta tese e deixar ensinamentos provenientes de terras lusitanas.

Aos Doutores que participaram da banca que avaliou minha qualificação, pela disponibilidade e críticas que ajudaram a construir esta tese, Prof. Dr. EVANDRO BARBOSA RIBEIRO, Prof. Dr. OZÓRIO JOSÉ DE MENEZES FONSECA E Prof. Dr. CLÁUDIO DO CARMO CHAVES, e àqueles que primeiro avaliaram o projeto Prof^a. Dra LUCIANA LEOMIL, Prof. Dr. VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA e Prof. Dr. JOSÉ ODAIR.

Ao Prof. Dr. JOSÉ ODAIR PEREIRA, Coordenador do PPG-Biotec por ocasião do meu ingresso no programa, pelo incentivo ao projeto, e também ao atual coordenador Prof. Dr. EDMAR VAZ DE ANDRADE, pela sua dedicação ao programa e por permitir que novas e diversas iniciativas continuem a florescer em meio a esta multidisciplinaridade.

Ao Diretor do Hospital Adriano Jorge, Dr. RAYMISSON MONTEIRO, pela disponibilidade em apoiar o Ensino e Pesquisa nesta Instituição.

À “mãe” UFAM, responsável por praticamente toda a minha formação acadêmica, e fomento do desenvolvimento do Estado do Amazonas e da Amazônia.

Aos funcionários e técnicos do laboratório de Tecnologia de DNA e Proteoma da PPG-Biotec de Manaus por sua colaboração e boa vontade, em especial Dina, e secretárias Nubiane dos Santos Freitas, Jéssica, Evandro Jr, Iran Baía e Rosinilda, sempre dispostos a ajudar um doutorando perdido, apressado e atrasado.

Aos professores que nos ministraram os cursos necessários ao Doutorado, em especial aos Doutores VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JR., LUCIANA LEOMIL, LUIZ ANTÔNIO DE OLIVEIRA, WOLFGANG SCHUMANN, DIMAS JOSÉ LASMAR, GUAJARINO DE ARAÚJO FILHO, CHARLES ROLAND CLEMENT, JANICE BARROS e vários outros professores convidados do INPA, FUCAPI, etc. que tornam este curso excelente não apenas pela formação técnica, mas por estimular o debate, o senso crítico e a formação do bom caráter nos alunos. Não encontramos apenas bons professores, mas pessoas que me deram um novo significado para a palavra patriotismo e DEFESA da Amazônia. Pessoas que poderiam estar muito bem em outro lugar do planeta, mas simplesmente não podem sair daqui porque encontraram aqui o seu lugar, no calor de 40 graus, quedas de energia elétrica, poeira e entre os mosquitos do Minicampus.

Aos médicos patologistas Prof. Dr. LUIZ CARLOS DE LIMA FERREIRA, ELIZABETH BEZERRA AZEVEDO, HELDER E HELBER FREITAS ALAGIA, LUCIANA BOTINELLY M. FUJIMOTO, JOSÉ LOUREIRO, MANOEL NILZOMAR D. MELO, AUGUSTO FELICIANO DE CASTILHO E Prof. Dr. NELSON BRANCACCIO DOS SANTOS, sem os quais esta obra não teria sido possível.

Aos atuais e ex-residentes em Otorrinolaringologia da Fundação Hospital Adriano Jorge (FHAJ), pela colaboração na coleta de dados desta apresentação, e em especial DIEGO CARVALHO, YENLY GONZALES FELIX, GISELE GONZAGA, NINA BROCK, ROBERTA GOBETH e ANDRÉ SARAIVA.

Ao diretor da Escola Superior de Ciências da Saúde Prof. Dr. CLEINALDO DE ALMEIDA COSTA, pelo incentivo à Pesquisa e Docência.

Aos colegas de Doutorado e trabalho, pela cooperação mútua, Dr. GECILDO SORIANO DOS ANJOS, pelo seu caráter e humildade, e Dr. RODOLFO FAGIONATTO DE FREITAS, pela persistência frente às adversidades e o otimismo, LUCIANA ARAÚJO CASSA-BARBOSA e FERNANDO FOLHADELA pelo incentivo e pela ajuda com o resultado final.

Aos acadêmicos de medicina da UEA e UFAM, que atuaram ativamente através de projetos de iniciação científica PAIC e PIBIC, particularmente a todos participantes da Liga da Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial, particularmente RODRIGO, ROGÉRIA, JOYCE, RAFAEL ARITA, CLÁUDIO “PIAUI”, RAPHAEL DI TOMMASO, EMANOEL e outros tantos ex-alunos.

Aos colegas que colaboraram com seu trabalho e apoio TOMÁS GARCIA, MARCO ANTÔNIO ROCHA, JOACY AZEVEDO, VIVIANE SALDANHA, SÚNIA RIBEIRO, ALVARO SIQUEIRA, RAILSON FARIAS, dentre outros tantos.

Aos Professores do Departamento de Arquivologia e Biblioteconomia SUELY OLIVEIRA MORAES e DAYSE BOTELHO, e estatístico AMAIKE KERIC, ao Prof. BENAIAS pela disponibilidade e atenção na elaboração final.

Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho.

Clarice Lispector

RESUMO

A citoqueratina 19 (CK 19) é um marcador molecular que expressa diferenciação e replicação celular e o oncogene HER-2 (*Human Epidermal Growth factor receptor-Type 2*), membro da família Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*EGFR*), uma proteína que quando sobre-expressa pode significar maior proliferação celular e agressividade em vários tipos de tumores, dentre eles mama, pulmão e próstata. Nas últimas décadas vêm aumentando o diagnóstico de alterações morfológicas da glândula tireoide, sendo que quando diagnosticado à ultrassonografia a prevalência do nódulo tireoideano chega a 20% a 30% na população geral. Objetivamos neste estudo prospectivo verificar a presença destes marcadores em glândulas tireoideas operadas em pacientes habitantes em região amazônica não litorânea, e sua relação com as alterações morfológicas encontradas. Foram selecionadas 34 amostras de tecido tireoidiano preservados em formol e armazenados em parafina, de pacientes operados na Fundação Hospital Adriano Jorge, de Manaus, Amazonas. Os pacientes corresponderam a seis homens e 28 mulheres, com idade entre 25 e 76 anos e média de 47 anos. Os tecidos corresponderam a nove bócios multinodulares (BMN), sete bócios coloides (BC), cinco hiperplasias nodulares (HN) quatro bócios adenomatosos (BA), três microcarcinomas papilíferos (MCP) e cinco carcinomas papilíferos da tireóide (CPT). Exames de imunohistoquímica em busca dos marcadores CK19 e HER-2 foram realizados em todos os tecidos usando anticorpos monoclonais BA17 (*mab* rato, Dako M0772, EUA) e SP3 (policlonal em coelho, Spring M3034, EUA) e o método esteptavidina-biotina-peroxidase (*Kit* LSAB, Dako, EUA) e análise estatística inferencial aplicando o teste *Exato de Fisher* com nível de significância de 5%. Não foi encontrada positividade para o marcador HER-2 em tecidos tireoidianos malignos ou benignos. Foram encontrados positividade média a forte intensidade para CK19 em todos os três pacientes com MCP, quatro CPT, um BMN e um BC. Foram encontrados positividade focal em um CPT, dois BMN, quatro BC e um BA. A análise estatística demonstrou significância estatística somente entre as variáveis CK 19 e tipo histopatológico. Os resultados da amostra analisada demonstraram que a pesquisa no oncogene HER-2 não apresentou presença deste marcador em nenhum dos tecidos tireoidianos, e o marcador CK 19 foi presente em maior intensidade nos casos de Carcinoma que nos tecidos benignos onde foi encontrado.

Palavras-chave: Bócio, imuno-histoquímica, Citoqueratina 19, C-erbB2, HER-2/neu, Carcinoma Papilífero da Tireóide

ABSTRACT

Cytokeratin 19 (CK 19) is a molecular marker that express cell replication and differentiation, and HER-2 oncogene (Human Epidermal Growth factor receptor-Type 2) is the second member of the human epidermal growth factor receptor (EGFR) family. Its overexpression can mean aggressiveness and poor prognostic in various kinds of tumors, as breast, lung and prostate. In last few decades the diagnostic of morphological changes of the thyroid gland was increased. When being diagnosed with ultrasound, the thyroid nodule prevalence reaches 20% to 30% in the general population. The aim of this prospective study is verify the presence of these markers in thyroid glands in operated non-coastal Amazon inhabitants, and its relationship with pathologic findings. We selected 34 samples of formalin-fixed, paraffin-embedded thyroid tumor tissues, from patients treated at Hospital Adriano Jorge, Manaus, Amazonas. The patients consisted of six men and 28 women, aged between 25 and 76 years, average 47 years. The tissues corresponded to nine multinodular goiter (MNG), seven colloid goiters (CG), five nodular hyperplasia (NH) four adenomatous goiters (AG), three papillary thyroid microcarcinoma (PTMC) and five papillary thyroid carcinomas (PTC). Immunohistochemistry (IHC) staining with CK 19 and HER-2 were performed using the labeled streptavidin–biotin peroxidase complex system (LSAB2, DAKO, USA) on all tissues using monoclonal antibodies BA17 mab mouse (Dako M0772, USA) and SP3 rabbit mab (Spring M3034, USA) and inferential statistical analysis applying (Fisher exact test with 5% significance level). HER-2 IHC was not found in all samples. We found a strong positive reactivity for IHC CK19 in all 3 patients with PTMC, in four with PTC, one with MNG, and one with CG. We found focal positivity for CK 19 in one PTC, two MNG, 4 CG and one AG. Statistical significance was found only between CK 19 and histopathology. The results suggest that HER-2 oncogene has no predictive or prognostic value in thyroid tissues and CK 19 marker showed affinity for PTC, although it is also found in benign tissues with less intensity.

Key-words: Goiter, Immunohistochemistry, cytoqueratin 19, C-erbB-2, HER-2/neu, Papillary Carcinoma of Thyroid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo unidade da Federação (neoplasia maligna da glândula tireoide).
Fonte: INCA (2012) 25
- Figura 2** - Figura esquemática mostrando uma célula normal e outra com hiper-expressão do gene HER-2 e suas consequências para a célula.
Fonte: modificado de Balseaga e Arteaga (2011) 32
- Figura 3** - Drogas que atuam como *target therapy* contra HER-2/neu e EGFR
Fonte: Nature Reviews (2006) 33
- Figura 4** - A. Paciente posicionada e anestesiada para a cirurgia da tireoide, com hiperextensão cervical. B. A retirada cirúrgica completa da glândula tireoide, além de linfonodos localizados na parte inferior (chamada zona VI). Observa-se nódulo de aspecto e coloração diversa da glândula localizado no istmo, transição entre os lobos direito e esquerdo. C. Amostras de tecido suficientemente representativos do nódulo são colocados em blocos de parafina. A seguir são confeccionadas lâminas contendo cortes histológicos de 3µm.
Fonte: Fotos do Autor (2011)..... 35
- Figura 5** - Fotomicrografia de resultado imuno-histoquímico demonstrando resultado negativo para HER-2, no paciente número 31, com histopatológico compatível com carcinoma papilífero.
Fonte: Bacchi (2012)..... 40
- Figura 6** - Fotomicrografia de resultado imuno-histoquímico demonstrando positividade focal para Citoqueratina 19, no paciente número 30, com histopatológico compatível com Carcinoma Papilífero.
Fonte: Bacchi (2012) 40
- Figura 7** - Fotomicrografia de resultado imuno-histoquímico demonstrando resultado positivo +++ para Citoqueratina 19, na paciente número 31 com histopatológico compatível com Carcinoma Papilífero
Fonte: Bacchi (2012) 41
- Figura 8** - Distribuição dos Pacientes quanto ao sexo.
Fonte: Autor (2012) 42
- Figura 9** - Distribuição quanto a Faixa Etária dos pacientes.
Fonte: Autor (2012) 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cruzamento da variável Citoqueratina 19 - (negativa, positiva focal e positiva) com a variável faixa etária, sexo e tipo histopatológico dos pacientes. Autor (2012)	43
Tabela 2 - Cruzamento da variável Citoqueratina 19 – (fraca, moderada, forte e negativa) com a variável faixa etária, sexo e tipo histopatológico dos pacientes. Autor (2012)	45
Tabela 3 - Cruzamento da variável tipo histopatológico com a variável faixa etária e sexo dos pacientes. Autor (2012)	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr.	doutor
Dra.	doutora
et al	e outros
ed.	edição
f.	fascículo
kDa.	kilodaltons
p.	página
Prof.	professor
Prof^a.	professora
Sr.	senhor
Sra.	senhora
Srta.	senhorita
v.	volume

LISTA DE SIGLAS

AG	<i>Adenomatous goiter</i>
BRAF	<i>B- type RAF kinase gene</i>
CDT	Carcinoma diferenciado da tireoide
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFT	Carcinoma Folicular da Tireoide
CITED-1	<i>Cell cycle-dependent transcriptional cofactor one</i>
CK 19	Citoqueratina 19
CGA	Campo de Grande Aumento
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CPT	Carcinoma Papilífero da Tireoide
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
EGP	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Family Receptor</i>
EUA	Estados Unidos da América
FUCAPI	Fundação Centro de Análise Pesquisa e Inovação
FUAM	Fundação Universidade do Amazonas
GAL-3	Galectina 3
HBME-1	<i>Monoclonal Mouse Anti-human Mesothelial Cell Clone Primary</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HER-2	<i>Human Epidermal Growth factor receptor-Type 2</i>
I¹³¹	Iodo 131
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
MCP	Microcarcinoma Papilífero
MNG	<i>Multinodular goiter</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
NEM IIb	Neoplasia Endócrina Múltipla tipo IIb
NH	<i>Nodular hyperplasia</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

ORL	Otorrinolaringologia
PCR-RT	Pesquisa de cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa - Tempo Real
PAAF	Punção Aspirativa com Agulha Fina
PAIC	Programa de Incentivo à Iniciação Científica
PAX-8/PPAR □	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PIBIC	Programa de Iniciação Básica e Incentivo à Ciência
PPG-BIOTEC	Programa Multi-Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia
PTC	<i>Papillary thyroid carcinomas</i>
PTMC	<i>Papillary thyroid microcarcinoma</i>
pT, N, M	Estadiamento Patológico – Tumor, Nódulo Linfático, Metástase
p53	<i>53 tumor-suppressor gene</i>
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homologue</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
SBC	Sociedade Brasileira de Citologia
SBORL-CCF	Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial
SFORL	Sociedade Francesa de Otorrinolaringologia
TCCLE	Termo de ciência e consentimento livre e esclarecido
TSAb	<i>Thyroid Stimulator Antibody</i>
TSI	<i>Thyroid Stimulator Immunoglobulin</i>
TSH	<i>Thyroid Stimulator Hormone</i>
TSHR	<i>Thyroid Stimulator Hormone Receptor</i>
TRKT	<i>Thyroid receptor kinase tyrosine</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UICC	União Internacional de Controle do Câncer
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas	
Lista de Siglas	
INTRODUÇÃO	18
1. OBJETIVOS	21
1.1 Objetivo Geral	21
1.2 Objetivos Específicos	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 O bócio	22
2.2 O câncer da tireóide	23
2.3 O tratamento	27
2.4 A Citoqueratina 19	29
2.5 Her-2	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material.....	35
3.1.1 Amostra.....	35
3.1.2 Critérios de inclusão e coleta de dados	36
3.2 Métodos	37
3.2.1 Análise histopatológica	37
3.2.1.1 Processamento da amostra e macrodissecção	37
3.2.2 Análise imuno-histoquímica	37
3.2.2.1 Material biológico	37
3.2.2.2 Avaliação das reações imuno-histoquímicas	39
3.2.3 Tratamento e análise dos dados	41
4. RESULTADOS	42
5. DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	
6161	
A. Termo de ciência e consentimento livre esclarecido	62
B. Formulário padrão.....	64
C. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	66

INTRODUÇÃO

Com a melhora técnica e barateamento de tecnologia de imagem médica, nas últimas décadas vêm aumentando o diagnóstico de alterações morfológicas da glândula tireoide. O nódulo tireoidiano palpável é encontrado em 4% a 7% da população adulta. Sua prevalência varia de 5,3% a 6,4% em mulheres e de 0,8% a 1,6% em homens, dependendo do estudo e da idade (GRAF, 2004). Quando diagnosticado à ultrassonografia a prevalência do nódulo tireoidiano é de 20% a 30% na população geral (GRAF, 2004) podendo chegar a 67% em mulheres com mais de 60 anos (CERUTTI, 2007), portanto, na maioria das vezes, os nódulos são impalpáveis e identificados nas ultrassonografias cervicais realizadas por razões nem sempre relacionadas à tiroide, e têm o tratamento baseado em aspectos clínicos e exames de imagem, laboratoriais e citopatológicos (BALOCH, *et al.*, 2002; CASTRO e GHARIB, 2003).

A retirada cirúrgica terapêutica da glândula tireoide reserva-se principalmente nos casos onde a mesma aumenta muito de volume – os chamados bóciós – e casos com diagnóstico ou suspeita de câncer da tiroide (ALEXANDER, *et al.*, 2012).

Tendo em vista o fato de que o desenvolvimento e a progressão dos tumores são decorrentes do acúmulo de alterações genéticas e/ou epi-genéticas no genoma das células somáticas tumorais e que essas alterações resultam em modulação da expressão gênica, a caracterização destes perfis de expressão dos tumores têm se tornado uma ferramenta importante para a descoberta de genes que estejam envolvidos na patogênese dos tumores e proteínas que possam ser utilizadas com marcadores de diagnóstico, prognóstico ou ainda alvos terapêuticos (MATSUO, *et al.*, 2004).

Um marcador biológico ideal deve ser específico e sensível para identificar o tipo tumoral e caracterizar o estágio da progressão neoplásica. Isto é muito difícil de conseguir

com um único gene como marcador. Existem vários protocolos de pesquisa envolvendo *pool* de genes ou biomarcadores (CHEN, *et al.*, 2001; CERUTTI, DELCELO e AMADEI, 2004; FINLEY, *et al.*, 2004), ou três genes (WEBER, *et al.*, 2005), quatro biomarcadores (CERUTTI, *et al.*, 2006) ou cinco (PRASAD, *et al.*, 2005), para investigação de tumores da tireoide, através de diversos métodos, como imuno-histoquímica (PRASAD, *et al.*, 2005), cDNA microarray (GIORDANO, *et al.*, 2005), pesquisa de Cadeia de Polimerase por Transcrição Reversa (PCR-RT), mais recentemente, proteômica em tumores pulmonares (KIKUCHI e CARBONE, 2007). Tais métodos exigem gastos elevados, tempo e material (peças congeladas, aparelhagem não usual) que tornam estes exames pouco acessíveis ao cirurgião permanecendo a imuno-histoquímica como um dos meios que mais rapidamente pode chegar ao uso clínico rotineiro (REED, *et al.*, 2008).

Alguns genes preditivos já foram identificados e são usados pelo método imuno-histoquímico rotineiramente em tumores de mama (HER-2/*neu*), próstata, ceco, e outros, norteando as condutas terapêuticas e livrando muitos pacientes de tratamentos desnecessários, caros e extremamente mórbidos como, por exemplo, a quimioterapia em cânceres de mama (ECCLES, 2001; SILVA, SADDI, MOMOTUK, 2002; BACCHI, *et al.*, 2010).

O método mais usado para avaliação dos nódulos tireoidianos, na maioria dos serviços, é a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) com subsequente análise citológica, guiada ou não pela ultrassonografia (GHARIB & PAPINI, 2007). Estes métodos não mudaram muito desde quando criados, na década de 1970 e ainda apresentam considerável índice de falsos negativos e positivos, pois são considerados exames subjetivos (FINLEY, *et al.*, 2004). Existem várias tentativas de aumentar a sensibilidade e especificidade da PAAF e assim diminuir a ainda alta incidência de cirurgias da tireoide de caráter diagnóstico. A principal é associar com a citologia com a imuno-histoquímica, método mais acessível e barato que exames genéticos (FINLEY *et al.*, 2004). A aplicação do método imuno-

histoquímico na identificação das células foliculares normais e neoplásicas tem sido realizado na tentativa de fazer o diagnóstico diferencial entre tumores tireoidianos benignos e malignos, na avaliação pré-operatória, na correlação com atipias morfológicas e com prognóstico desfavorável (BARTOLAZI, GASBARRI, PAPOTTI, 2001; BALOCH, *et al.*, 2002; CASTRO e GHARIB, 2003; FINLEY, *et al.*, 2004; PRASAD, *et al.*, 2005; GRIFFITH, *et al.*, 2006). Apesar de todos estes esforços, até o momento não dispomos de um marcador único eficiente que auxilie na indicação do tratamento clínico ou cirúrgico dos tumores tireoidianos, o que poderia auxiliar na conduta terapêutica e, quem sabe, economia de recursos no tratamento desta doença tão prevalente.

Neste projeto de pesquisa buscamos verificar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores Citoqueratina 19 e HER-2 em bócios operados em um hospital do Amazonas. Deste estudo verificaremos o comportamento biológico dos bócios, pois a Citoqueratina 19 é um marcador que expressa diferenciação e replicação celular presente em vários tipos de câncer como próstata e pulmão, e o HER-2, abreviatura de “*Human Epidermal Growth factor receptor-Type 2*”, também conhecida como C-ErbB2, Her-2/neu ou CERBB2, segundo membro da família dos Fatores de Crescimento Epidérmico Humano (EGFR), uma proteína que em quantidade normais tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento de células epiteliais e quando sobre-expresso pode significar maior ploriferação celular e agressividade em determinados tipos de tumores malignos, dentre os quais, o câncer de mama, onde já é utilizado rotineiramente.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Verificar a expressão do marcador molecular Citoqueratina 19 (CK 19) e da proteína HER-2 (Human Epidermal Growth Factor receptor-Type 2, também conhecida como HER-2/neu ou C-erbB2) nos bócios e neoplasias tireoidianas de indivíduos operados em um hospital de Manaus, Amazonas.

1.2 Objetivos Específicos

- Verificar se os bócios e as neoplasias tireoidianas operados no Hospital Adriano Jorge apresentam expressão ausente, fraca, moderada ou forte do marcador CK19 e se esta expressão apresenta correlação estatística com as demais variáveis estudadas, principalmente tipo histopatológico.
- Verificar se os bócios e neoplasias tireoideanas estudadas apresentam expressão imuno-histoquímica do proto-oncogene HER-2, hiperexpresso em várias outras neoplasias humanas, e quantificar esta expressão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O bócio

O bócio é qualquer aumento de volume da glândula tireoide, não importando a etiologia ou fisiopatologia. Contudo, sob a perspectiva da histopatologia, o bócio representa uma hipertrofia difusa do tecido tireoidiano em consequência da hiperplasia das células foliculares. Quanto à fisiologia, quase sempre o bócio se acompanha de hipotireoidismo, levando à graves consequências ao indivíduo e mesmo ao intelecto, pois a biossíntese do hormônio tireoidiano tem um importante papel no metabolismo, crescimento e maturação de vários importantes órgãos, particularmente o sistema nervoso central (BOTELHO e GEHANNO, 2002; CASTRO e GHARIB, 2003).

Com a melhora dos exames de imagem, principalmente a ecografia, cada vez mais se detectam alterações na anatomia tireoidea, e até nódulos não palpáveis podem ser aspirados por uma punção com agulha fina (PAAF), que se tornou um dos exames mais importantes no pré-operatório da cirurgia da glândula tireoide (CASTRO e GHARIB, 2003; ALEXANDER, *et al.*, 2012). Mas a sensibilidade e especificidade destes exames são limitadas, pois são dependentes da experiência do examinador e muitas vezes somente o exame histopatológico e imuno-histoquímico podem dar uma maior segurança ao pesquisador (CASTRO e GHARIB, 2003, ALEXANDER, *et al.*, 2012).

A regulação do crescimento dos tireócitos (unidades morfológicas da tireóide) por fatores externos, principalmente os alimentares, tem sido extensivamente estudada e tem influenciado a terapia de tumores benignos e malignos da tireoide. A regulação externa do crescimento da glândula tireóide foi reconhecida pelos chineses cerca de 2000 anos atrás, quando algas ricas em iodo foram dadas para as pessoas que viviam longe do mar para prevenir ou tratar a formação do bócio (GORETZKI, *et al.*, 2000). A suplementação de iodo na dieta foi iniciada na Suíça e nos Estados Unidos, mesmo antes que as vias de regulação

entre a tireóide e a hipófise fosse elucidada. Por outro lado, a suplementação de iodo nunca chegou à aceitação legal na Alemanha, apesar dos dados epidemiológicos, científicos e clínicos convincentes. Esta falta de iodo na dieta alimentar ainda resulta em uma prevalência de bócio de até 60% em mulheres idosas na Alemanha, demonstrando um exemplo perfeito de morbidade desnecessária e explosão de custos em cuidados de saúde devido decisões judiciais equivocadas (DELANGE e BURGI, 1989).

2.2 O câncer da tireóide

Os carcinomas de tireoide se originam de dois tipos celulares: carcinoma medular originário de células parafoliculares e as neoplasias de células epiteliais foliculares. Os primeiros são raros e correspondem a menos de 3% dos casos, são os chamados carcinomas medulares da tireoide (CMT). O restante das neoplasias malignas são os tumores derivados das células foliculares, são os chamados carcinomas diferenciados da tireoide: carcinomas papilíferos (80 a 85%) e carcinomas foliculares (10 a 15%), e cerca de 1 a 2% corresponde ao carcinoma indiferenciado ou anaplásico, a neoplasia folicular mais agressiva da tiroide, e outros tumores mais raros (MATSUO, *et al.*, 2004).

Em contraste com alterações bociogênicas e benignas, a prevalência do câncer de tireóide não difere significativamente entre os países com ingestão alta e baixa de iodo, então devemos nos concentrar em outros fatores, além da ingesta de iodo, quando o crescimento de tumores malignos da tiróide é avaliada (GALANTI, *et al.*, 1995). A distribuição entre os tipos de carcinoma folicular e papilar da tireóide, no entanto, demonstra que o carcinoma folicular ocorre mais em áreas com baixa ingesta de iodo, e o carcinoma papilar ocorre mais quando a suplementação de iodo é realizada (GALANTI, *et al.*, 1995; CERRUTI, 2007; INCA, 2011).

Fatores conhecidos que influenciam a prevalência do câncer de tireóide são o sexo, a idade, disposição hereditária para o carcinoma da tireóide (NEM IIB) e exposição à radiação externa (DE GROOT, 1976; SCHLUMBERGER, *et al.*, 1998). O efeito da radiação tornou-se evidente depois de experimentos em ratos e após o acidente de Chernobyl, quando um aumento de câncer de tireóide foi detectado em crianças da Bielorrússia alguns anos depois (KLUGBAUER, *et al.*, 1998).

O câncer surge de uma mutação inicial em algum gene envolvido na regulação de proliferação ou diferenciação celular, ocorrendo então, expansão clonal da célula geneticamente modificada devido à sua maior capacidade de proliferar e escapar ao controle do ciclo celular e dos sinais que induzem a apoptose, predispondo ao acúmulo de mutações sucessivas (MATSUO, *et al.*, 2004). O entendimento da tumorigênese depende da identificação das mutações que levam à expansão clonal. Na tireoide, padrão de expansão clonal é observado tanto em neoplasias benignas (bócios e adenomas) quanto malignas. Até o momento, foram identificadas mutações no gene do receptor de TSH (*TSHR*) e mutações em adenomas hiperfuncionantes; mutação de *RAS* é encontrada tanto em lesões benignas quanto malignas, mas predominantemente em carcinoma folicular; rearranjo *PAX-8/PPAR β* em carcinoma folicular; mutação de p53 em carcinoma anaplásico, rearranjo *RET/PTC* e de *TRKT* em carcinoma papilífero e, mais recentemente, mutação de *BRAF* em carcinoma papilífero. Interessantemente, em carcinomas papilíferos não se observa sobreposição de mutação de genes *RET/PTC* ao de *BRAF* e de *RAS*, refletindo uma diversidade biológica desta neoplasia que necessita ser elucidada. Entretanto, mesmo sem a identificação precisa destas mutações, podemos observar uma série de alterações na expressão ou função dos fatores de crescimento, receptores e sinalizadores intracelulares, que auxiliam no entendimento da patogênese, com potencial como marcadores em tumores de tireoide (MATSUO, *et al.*, 2004).

Dados oficiais do Ministério da Saúde Brasileiro através do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimam para o Brasil, em 2012, 10.590 casos novos de câncer da tireoide, com um risco estimado de 11 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 01). Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer da tireoide em mulheres é o terceiro mais incidente na região Norte (7/100 mil). Nas regiões Sudeste (15/100 mil) e Nordeste (6/100 mil), ocupa a quarta posição, e, nas regiões Sul (10/100 mil) e Centro-Oeste (6/100 mil), a quinta e sexta posições, respectivamente.

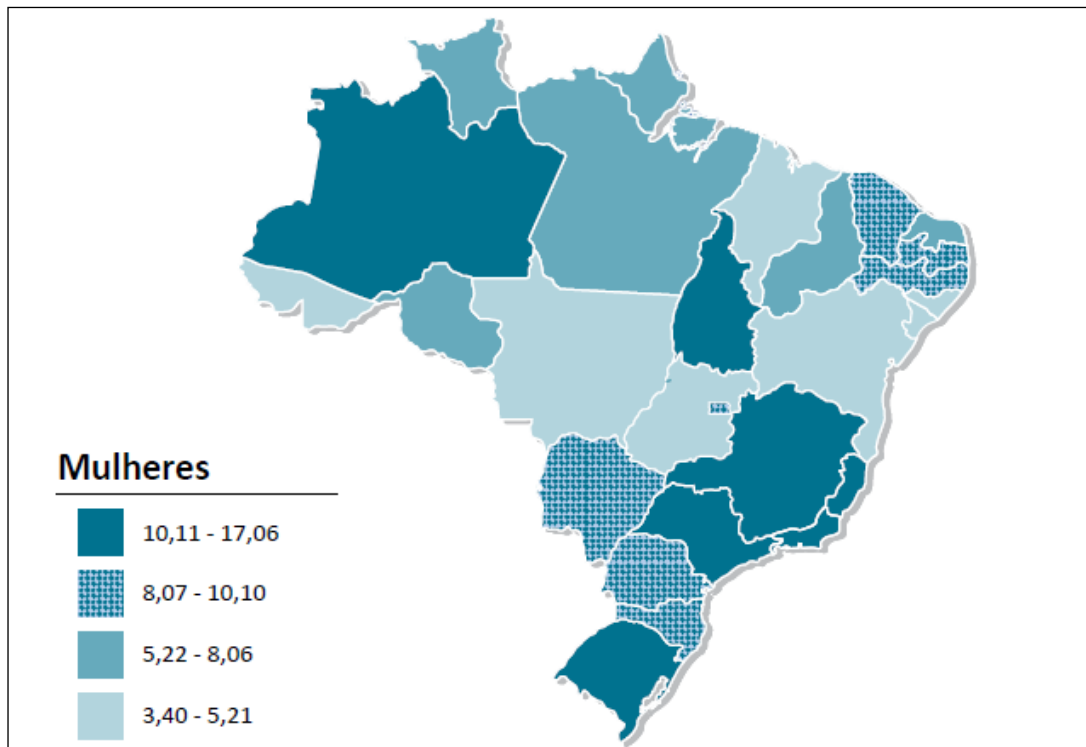


Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da glândula tireoide).
Fonte: INCA/MS (2012).

A magnitude em homens ainda é muito pequena e, portanto, o cálculo da estimativa não foi realizado, mas sabe-se que quando um homem apresenta um nódulo na tireoide a chance de ser câncer é cinco vezes maior que nas mulheres. Os outros tumores mais incidentes em mulheres no Brasil são os tumores de pele não melanoma (71 mil casos novos), mama (53 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (16 mil) e pulmão (10 mil) que vem

disputando com tireoide este quinto lugar no Brasil como um todo. Há poucos anos o câncer da tireoide ocupava apenas a sétima colocação (INCA, 2011).

Na maioria dos países, as taxas de incidência vêm mostrando um padrão de crescimento lento, porém contínuo (cerca de 1% ao ano) durante as últimas décadas. Segundo as informações do último volume da publicação *Cancer Incidence in Five Continents*, durante o período de 1973 a 2002, as taxas de incidência aumentaram mais de cinco vezes na maioria das populações analisadas (DAVIES e WELCH, 2006; CURADO, *et al.*, 2007). As taxas de mortalidade apresentam queda continuada na maioria das populações, provavelmente em virtude da melhoria do tratamento. O aumento do uso de ultrassom e biópsia guiada por imagem para detecção de doença subclínica é uma possível explicação para essa tendência de aumento nas taxas de incidência. Todavia, observou-se também um aumento no diagnóstico de neoplasias com tamanhos acima de quatro centímetros e com metástases à distância, sugerindo, de fato, um aumento real na incidência da doença devido a outros fatores, incluindo os ambientais, de dieta e os genéticos (HODGSON, BUTTON, SOLORZANO, 2004; INCA, 2011).

2.3 O diagnóstico e o tratamento

Com o crescente número de diagnósticos ultrassonográficos de nódulos tireoidianos, os gastos médicos com investigação e tratamento tendem a aumentar cada vez mais (GHARIB e PANINI, 2007). Quanto à escolha do tratamento adequado, o médico leva em conta os diversos exames de imagem e laboratoriais, orientando cada caso para acompanhamento, tratamento clínico ou cirurgia, que pode ser a retirada total ou parcial da glândula (BOTELHO, *et al.*, 2002).

Como exames laboratoriais temos à disposição dosagem dos hormônios tireoidianos (T3, T4, T4L), hipofisários (TSH), Proteínas (Tireoglobulina) e anticorpos (Anticorpos anti-

tireoglobulina, anticorpo anti-microsomal) presentes no sangue, que nos orienta se a glândula encontra-se hipofuncional (hipotireoidismo), hiperfuncional (hipertireoidismo) ou acometida por doença auto-imune (anticorpos). Dos diversos exames de imagem, como tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética, cintilografias e outros, o mais usado e com boa acurácia é a ultrassonografia com ou sem Doppler (BOTELHO, *et al.*,2002). Estes diversos exames podem orientar o diagnóstico e tratamento das múltiplas doenças que acometem esta complexa glândula.

Os maiores dilemas diagnósticos e terapêuticos atualmente se encontram na doença nodular ou multinodular da tireoide, quando se busca afastar a malignidade de um nódulo encontrado pelo exame de imagem, sem repercussão nos exames laboratoriais. Atualmente, na avaliação dos nódulos tireoidianos, o exame “padrão – ouro” chama-se punção aspirativa por agulha fina (PAAF), que consiste na coleta de material do nódulo através de uma agulha comum, guiada ou não pelo ultrassom (GHARIB e PANINI, 2007). Deste material é feito um esfregaço em uma lâmina, corado com hematoxilina-eosina (HE) e examinado por um patologista, que pode classificar os achados citológicos usando critérios da classificação de Bethesda (CIBAS e ALI, 2009) em cinco categorias, sendo a primeira chamada material não diagnóstico ou insuficiente até a última que indica forte suspeita de malignidade. O grande problema é que de 15 a 30% destas punções e repunções caem em uma categoria chamada de “diagnóstico citológico indeterminado”, e muitos destes pacientes, principalmente por medo de falsos positivos ou negativos, optam pela cirurgia, muitas vezes mais diagnóstica que propriamente terapêutica (ALEXANDER *et al.*, 2012). HERSMAN (*apud* ALEXANDER *et al.*, 2012) comenta este artigo no qual é testado um Kit comercial oferecido por uma empresa de biotecnologia (Veracyte Company) em 577 casos considerados indeterminados em todo os Estados Unidos, ele pesa os prós e contras de usar um exame genético (*micro array* com 167 genes) nestes pacientes, que promete quase 100% de certeza diagnóstica, haja vista que cada

exame citológico tem um custo estimado de 300 dólares e o exame genético oferecido 3.350 dólares. Portanto buscam-se hoje marcadores moleculares que indiquem o maior ou menor potencial de crescimento desses bócio e agressividade dos tumores, e ao mesmo tempo sejam acessíveis ao uso clínico habitual.

Quanto à escolha do procedimento cirúrgico, ou seja, se retirada total ou parcial da tireóide, também é objeto de controvérsia, pois o bócio é uma doença benigna e a retirada total da tireóide leva ao hipotireoidismo que, quando não adequadamente corrigido acarreta comorbidades consideráveis ao paciente (BOTELHO, *et al.*, 2001; GRAF, 2004). Por outro lado, a retirada parcial da tireóide também pode levar a futuras complicações, sendo a mais comum a recidiva do bócio e o hipotireoidismo subclínico. BOTELHO *et al.* (2002) encontraram 15% de recidiva em seguimento de 10 anos em bócios tratados com tireoidectomias parciais (na literatura a recidiva chega a 45%) e a reoperação da glândula tireóidea aumenta o risco de complicações em dez vezes.

Outra modalidade de tratamento inclui dose terapêutica de I^{131} (iodo 131 radioativo). Este tratamento é reservado àqueles pacientes com diagnóstico de carcinomas diferenciados da tireoide, ou seja: o carcinoma papilífero e o folicular (BOTELHO e GEHANNO, 2002), como tratamento adjuvante após a realização de tireoidectomias totais. Apesar de vários protocolos indicarem o uso do iodo radioativo somente naqueles casos maiores de 1 cm ou com metástases locais e a distância, hoje em dia se usa mesmo em microcarcinomas (menores de 1 cm). DOUGALL e CAMARGO (2007), baseados em dados epidemiológicos, questionam se não estaríamos tratando estes pacientes além do necessário, advogando inclusive tireoidectomias parciais sem iodoterapia para casos selecionados de microcarcinomas diferenciados da tireoide, que habitualmente têm bom prognóstico e evolução benigna.

2.4 A Citoqueratina 19

As citoqueratinas, uma das cinco classes de filamentos proteicos citoplasmáticos, são normalmente expressas em células epiteliais e mesênquimais normais. Tumores epiteliais geralmente expressam o filamento intermediário em seu tecido de origem. Tecidos tireoidianos com neoplasias benignas e malignas podem apresentar uma variedade de citoqueratinas (BARTEK, *et al*, 1985).

A Citoqueratina 19 (CK 19), uma proteína de 40 kDa, é a menor de uma classe denominada de citoqueratinas maiores, e pode ser detectada em tecido através de eletroforese ou através de imuno-histoquímica (IHQ).

A Citoqueratina 19 (CK 19) é um marcador expresso em uma variedade de epitélios normais e neoplásicos, sendo seu uso diagnóstico bem estabelecido em tumores malignos da mama, cólon, pulmão e próstata. Também hoje também se buscam anticorpos contra proteínas codificadas por este gene (ou uma combinação de genes de citoqueratina e outros marcadores) para a detecção de células tumorais circulantes na mama, pulmão, cólon, e outras cânceres (REED, *et al*, 2008). A presença de proteínas da CK 19 em sangue periférico, por exemplo em tumores como o carcinoma pulmonar de Não Pequenas Células, pode significar presença do tumor e metástases. Pesquisas semelhantes também já foram feitas em pacientes com tumores prostáticos e mesmo tireoide. Os fragmentos de CK19 solúveis (Cyfra 21.1) podem ser medidos por ensaios imunométricos empregando anticorpos monoclonais específicos. Estudos constataram que podem haver diferenças nos níveis séricos de Cyfra 21.1 entre pacientes com nódulos benignos e pacientes com carcinoma. A liberação de CK 19 para a corrente sanguínea parece estar fortemente relacionada com o percurso apoptótico e com a hiperproliferação celular relacionada com apoptose (GIOVANELLA, *et al.*, 2008).

Os padrões de expressão das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19 nos distintos tipos de neoplasias tireóideas benignas e malignas despertaram interesses em novos estudos e

apresentaram forte expressão em tecidos tireoideos normais e em carcinomas papilíferos da tireóide (CPTs), porém mostrou fraca expressão em alguns carcinomas e adenomas foliculares. Enquanto algumas neoplasias bem diferenciadas com características papilares têm diagnóstico simples e bom prognóstico, outras, notadamente as de aspecto folicular, têm diagnóstico citológico incerto, o que induz a um aumento do número de procedimentos cirúrgicos na glândula tireoide muito mais de caráter diagnóstico do que terapêutico (BALOCH, *et al.*, 2002; CERUTTI, 2007). Apesar de alguns autores terem concluído que as citoqueratinas eram úteis na distinção entre as neoplasias epiteliais tireoideas, outros mostraram resultados diversos, limitando seu uso para diagnóstico (CERUTTI, 2007).

De qualquer forma a CK 19 tornou-se mundialmente usada como mais um dado adjuvante para a confirmação diagnóstica dos carcinomas papilíferos (CPT) bem diferenciados da tireoide (CDP), pois apresenta expressão aumentada em CPTs e baixa em bócios coloides e áreas foliculares, destacando-se como um dos marcadores mais usados. Também há trabalhos que o utilizam associado a outros marcadores (GAL-3, fibronectina-1, CITED-1, HBME1) para diferenciar o CPT do carcinoma folicular da tireoide (CFT) e de outras neoplasias malignas e benignas em até 97% dos casos, aumentando a sensibilidade e especificidade do marcador (BEESLEY e MCLAREN, 2002; PRASAD, *et al.*, 2005).

Também encontramos a CK 19 sendo usada para diferenciar áreas papilares e de CPTs em bócios multinodulares (ERKILIC *et al.*, 2002) e o uso em biópsias aspirativas por agulha fina (PAAF) para aumentar a sensibilidade do método no diagnóstico de CPTs, tendo se revelado altamente sensitivo (BEESLEY e MCLAREN, 2002; FINLEY, *et al.*, 2004).

2.5 HER-2 ou C-erbB-2

A literatura mostra para este marcador vários nomes e também algumas grafias diferentes: c-erbB-2; cerbB-2; C-erbB-2; HER-2; HER-2/neu; ERBB2; erbB2; erbB-2; oncogene neu; neu/c-erbB-2; proteína neu; neu. Nesta tese optamos por usar a designação HER-2.

O HER-2 tem sido extensamente estudado em carcinomas de mama desde que Slamon *et al.* (1987) demonstrou uma associação entre a sua amplificação e um mau prognóstico (*apud* EISENBERG & KOIFMAN, 2001). O método imuno-histoquímico é atualmente o método mais empregado para a detecção de HER-2, sendo mais conveniente que outras análises, como o FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), não somente porque a técnica é mais fácil, mas também porque existem evidências de que a despeito da alta correlação entre a amplificação do gene e a expressão aumentada de HER-2, esta última pode estar presente sem a amplificação do gene (ECCLES, 2001; EISENBERG e KOIFMAN, 2001).

O oncogene Her-2 localiza-se no cromossomo 17q21 e codifica um receptor glicoprotéico transmembrana denominado p185neu/p285 erbB-2, um dímero, sendo classificada como uma glicoproteína transmembrana de 185 KDa, contendo um domínio extracelular de ligação e um domínio de atividade intracelular de tirosina quinase (TK). O oncogene HER-2 é o segundo membro da família de receptores Fatores de Crescimento Epidérmico ou EGFR (Epidermic Grow Factor Receptor). Ele pode ser encontrado hiper-expresso em muitos tipos diferentes de cânceres humanos, incluindo os da mama, ovário, pulmão, gástrico, esôfago e orais. A expressão aumentada da oncoproteína HER-2 acarreta autofosforilação do receptor específico e subsequente ativação de quinases envolvidas em mecanismos de transdução de sinais, o que eventualmente afeta a transcrição de genes reguladores da progressão do ciclo celular (Figura 2). No entanto, ainda não é clara a forma como uma via de sinal específico pode corresponder a uma resposta biológica específica

(OLAYOYE, *et al.*, 2001). De qualquer forma, a superexpressão de HER-2 em alguns tipos de câncer e particularmente no câncer de mama tem sido associado com a pior sobrevida global, maior malignidade e fenótipos metastáticos (ECCLES, 2001).

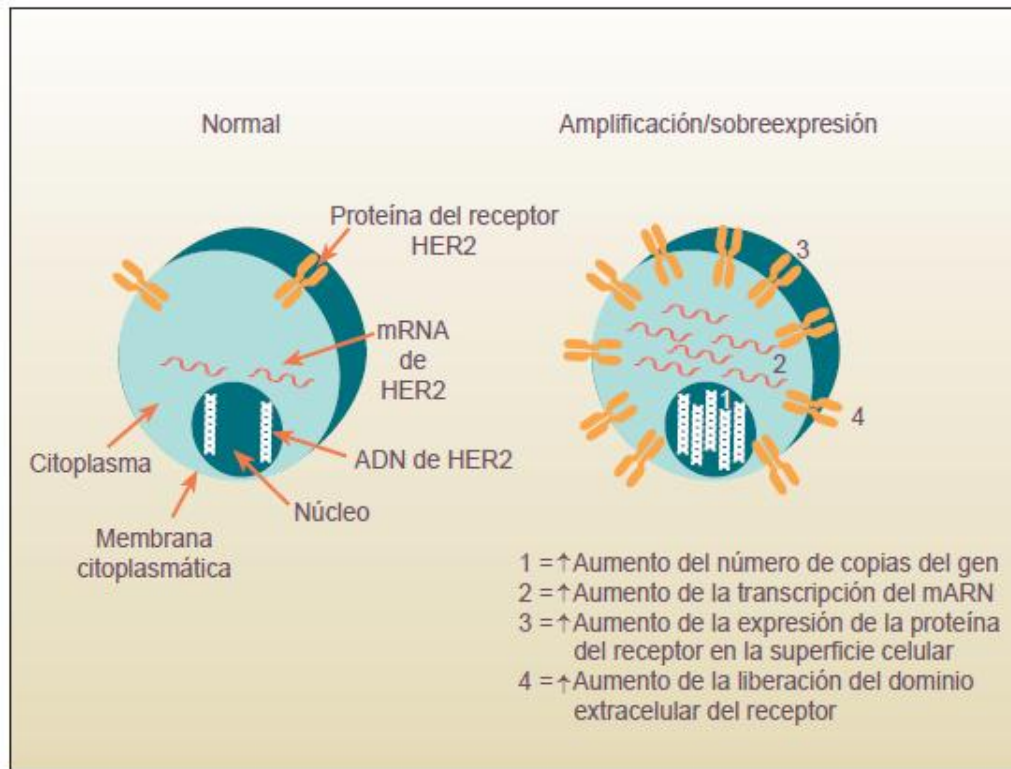


Figura 2: figura esquemática mostrando uma célula normal e outra com hiper-expressão do gene HER-2 e suas consequências para a célula.

Fonte: modificado de Balseaga e Arteaga (2011)

Aproximadamente 20%-25% dos tumores de mama apresentam amplificação deste oncogene, mas os índices aumentam para 40% quando pacientes apresentam linfadenomegalias metastáticas positivas. Esta superexpressão pode estar associada com pior prognóstico e falta de resposta a determinadas drogas antitumorais em pacientes com câncer de mama (SILVA, SADDI, MOMOTUK, 2002).

Mais de 20 anos atrás, Mendelsohn et al propuseram que a família EGFR poderiam ser usadas como terapia-alvo em tipos de câncer (*Target therapy*) (*apud* ECCLES, 2001). Com duas classes de agentes anti-EGFR com estabelecida atividade clínica em câncer, esta hipótese foi agora confirmada. Como esperado, o desenvolvimento clínico de anticorpos anti-

EGFR é altamente dependente do tipo de tumor a ser estudado, exigindo para cada tumor pontos diferentes de estudo, baseados em regimes de quimioterapia, e potencial para integração com radioterapia (RT) (OLAYOYE, 2001). Atualmente o receptor do Fator de crescimento epidérmico (EGFR) é considerado alvo terapêutico para o tratamento de câncer de pulmão e carcinoma colorretal metastático. Existem atualmente dois tipos de drogas que bloqueiam o EGFR. A primeira classe inclui os anticorpos monoclonais panitumumab e cetuximabe (Figura 3). A segunda classe inclui pequenas moléculas, como os inibidores de tirosino-quinase gefitinib e erlotinib. Ambos os tipos de drogas inibem a sinalização molecular deflagrada por EGFR.

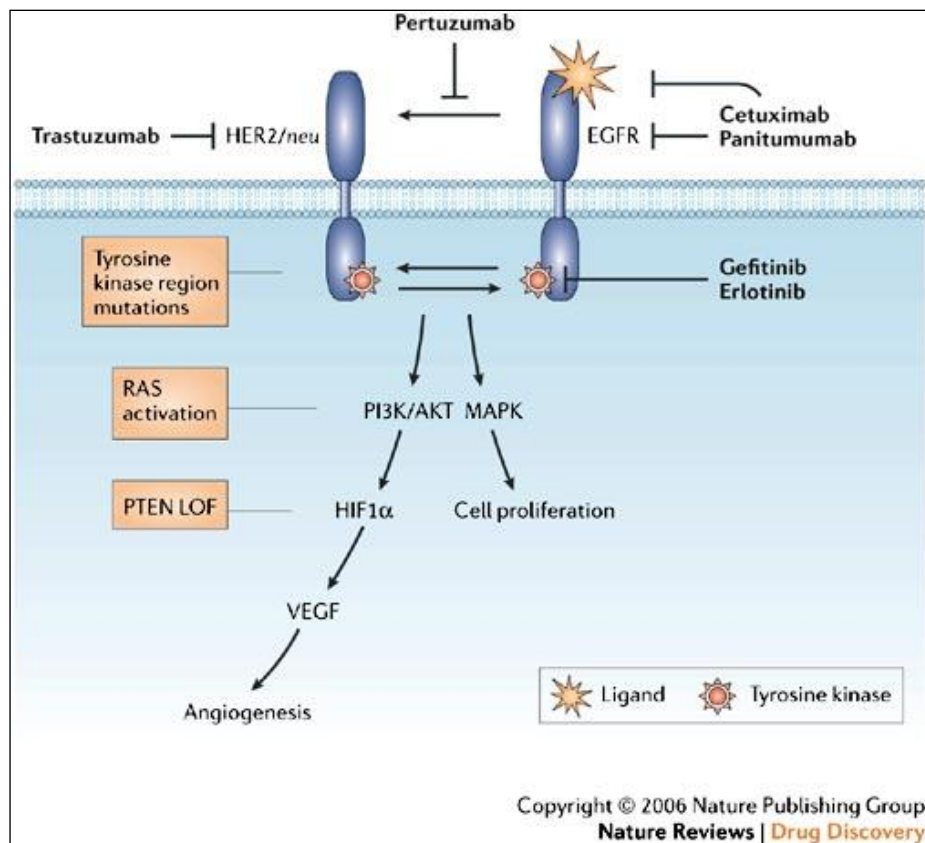


Figura 3. Drogas que atuam como *target therapy* contra HER-2/neu e EGFR.
Fonte: Nature Reviews (2006).

Embora a introdução de terapias alvo contra HER-2, tais como o anticorpo monoclonal trastuzumab (Figura 3) e a molécula pequena, lapatinib (inibidor da tirosina

quinase), tenha melhorado significativamente os resultados de câncer da mama HER-2 + em comparação com as terapias disponíveis anteriormente, a utilização destas terapias alvo é muitas vezes limitada pelo desenvolvimento de resistência às drogas e problemas de tolerabilidade (AWADA, *et al.*, 2012). Isto não impediu que existam vários estudos, em várias fases em andamento, com estas drogas, para tratamento por exemplo de carcinoma de esôfago avançado (cetuximabe), câncer de próstata, câncer de cólon avançado e pulmão (BALSEAGA e ARTEAGA, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostra

A amostra do estudo foi selecionada de pacientes submetidos a tireoidectomias totais e parciais na Fundação Hospital Adriano Jorge, Manaus-Amazonas nos anos de 2008 a 2011 (Figura 4A e 4B). Foram selecionados 34 pacientes, os demais foram excluídos ou por se recusarem a participar da pesquisa e/ou não passarem pelos critérios de inclusão.

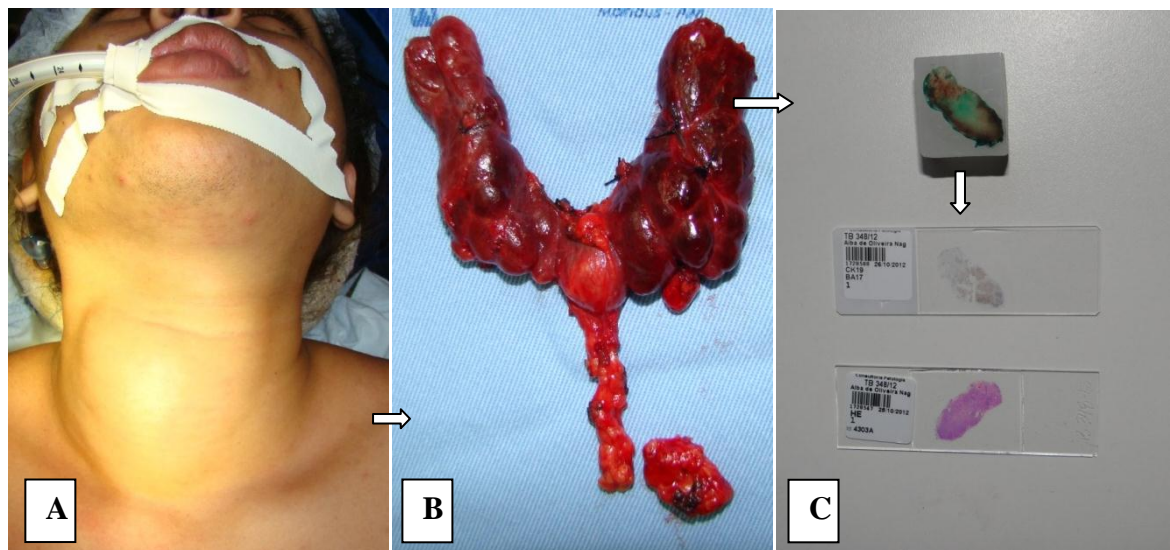


Figura 4: **A.** Paciente posicionada e anestesiada para a cirurgia da tireoide, com hiperextensão cervical. **B.** A retirada cirúrgica completa da glândula tireoide, além de linfonodos localizados na parte inferior (chamada zona VI). Observa-se nódulo de aspecto e coloração diversa da glândula, localizado no istmo, transição entre os lobos direito e esquerdo. **C.** Amostras de tecido suficientemente representativos do nódulo são colocados em blocos de parafina. A seguir são confeccionadas lâminas contendo cortes histológicos de 3µm. Fonte: Fotos do Autor (2011).

3.1.2 Critérios de inclusão e coleta de dados

A coleta foi iniciada após aprovado o projeto em Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), em observação a Resolução 196/96, da CONEP (Anexo 3) e adquiridos os recursos iniciais. Como critérios de inclusão foram considerados: tecidos tireoidianos incluídos em blocos de parafina (Figura 4C) acompanhados de laudo histopatológicos, de pacientes submetidos à tireoidectomias totais ou parciais, de ambos os sexos e em todas as faixas etárias. Os blocos parafinizados deveriam conter áreas suficientes e viáveis de tecido tireoidiano com diagnóstico histopatológico de doenças benignas ou malignas, de pacientes não submetidos a tratamentos prévios como radio-iodoterapia ou exposição à radiação em doses elevadas, registro de peso da peça cirúrgica, serem de pacientes habitantes da região amazônica não litorânea, incluindo o Amazonas e estados adjacentes. Foram excluídas pacientes com hipertireoidismo, tumores raros, metástases de outros tumores primários, neoplasias medulares e indiferenciadas, de origens genéticas e autoimunes (tireoidites).

Ao laudo histopatológico foi anexado um questionário (anexo 2) com dados pessoais e neste foram anotados todos os resultados dos exames complementares realizados e a indicação da cirurgia. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi explicado aos pacientes que assinaram autorizando a anotação dos dados e a utilização de fragmentos de suas biópsias para esta pesquisa.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise histopatológica

3.2.1.1 Processamento da amostra e macrodissecção:

As amostras de tecido tireóideo colhidas no centro cirúrgico foram inicialmente fixadas em formol tamponado a 10%, pesadas em balança de precisão e emblocadas rotineiramente em parafina (Figura 4C).

O estudo das características histopatológicas foi feito através de microscopia ótica nas lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) por patologistas capacitados do laboratório que atua no Hospital Adriano Jorge, sob responsabilidade do Prof. da Universidade Federal do Amazonas e Instituto de Medicina Tropical do Amazonas Dr. Luiz Carlos Ferreira e José Loureiro. As lesões foram classificadas segundo critérios mundialmente aceitos (HEDINGER, WILLIAMS, SOBIN, 1988; BACCHI *et al.*, 1999).

3.2.2 Análise imuno-histoquímica

3.2.2.1 Processamento do material biológico:

O material biológico (tecidos tireoidianos) armazenados em blocos parafinados foi todo ele examinado em conjunto no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista- UNESP, sob a direção e a coordenação do Prof. Dr. Carlos Eduardo Bacchi. De cada bloco de parafina, foi confeccionada uma lâmina contendo um corte histológico de 3µm (Figura 4C). As lâminas contendo os cortes histológicos foram submetidas ao seguinte procedimento:

1. O passo inicial foi realizado em PTLink (DAKO), equipamento responsável pela desparafinização e recuperação antigênica de tecidos parafinados, em tampão de pH alto para HER-2 e baixo para CK19, ambos por 20 minutos.
2. As lâminas foram retiradas do equipamento e incubadas em solução de lavagem (Envision Flex Wash Buffer – solução salina tamponada com Tris contendo Tween 20, pH 7.6) por 5 minutos.
3. Aplicação de solução de bloqueio de peroxidase por 5 minutos (Envision Flex peroxidase block) – tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio, NaN_3 e detergente.
4. Solução de lavagem por 5 minutos.
5. Aplicação do anticorpo primário (incubar overnight)
6. Solução de lavagem por 5 minutos.
7. Aplicação de polímero (Envision Flex/HRP) – dextran acoplado com moléculas de peroxidase e anticorpo secundário direcionado contra imunoglobulinas de coelho e camundongo.
8. Solução de lavagem por 5 minutos.
9. Aplicação de solução de trabalho (Envision Flex Substrate Working Solution – DAB mais solução tamponada contendo peróxido de hidrogênio)
10. Solução de lavagem por 5 minutos.
11. Contra-coloração com hematoxilina.
12. Banho em água corrente por 10 minutos
13. Banho em água destilada.
14. Desidratação em soluções com concentrações crescentes de álcool, 70%, 96% e 100%.
15. Colocação automatizada da lamínula.

Os clones dos anticorpos testados foram: para Citoqueratina 19 o BA17 da companhia DAKO (clone BA17 *mab mouse* – DAKO M0772) PT link 20 minutos, pH baixo, diluição de

1:1600 e para o HER-2 foi o clone SP3 (*mab rabbit* – Spring M3034) PT link 20 minutos, pH alto, diluição de 1:800.

3.2.2.2 Avaliação das reações imuno-histoquímicas.

As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas da seguinte maneira:

1. Avaliou-se a presença ou ausência da reação imuno-histoquímica, utilizando àcinos ou ductos de glândulas écrinas como controles internos para a reação. O controle negativo foi obtido substituindo-se o anticorpo primário por solução salina tamponada. A imuno-expressão do HER-2 foi confirmada com a coloração das membranas celulares em cor castanha. Os resultados foram analisados semi quantitativamente utilizando-se os seguintes parâmetros:

(-) nenhuma célula positiva (Figura 5).

(+) positividade em menos de 10% das células: imunorreatividade de membrana, fraca e irregular em pelo menos 10% das células.

(++): imunorreatividade de membrana, de intensidade fraca a moderada, porém regular em mais de 10% das células. Obs: nestes casos é recomendável realizar outro exame para verificar se o resultado é confiável, o estudo dos cortes com a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH na sigla inglesa) que irá determinar a presença ou não da amplificação gênica (WOLF, 2007).

(+++): imunorreatividade de membrana, com forte intensidade, em pelo menos 30% das células.

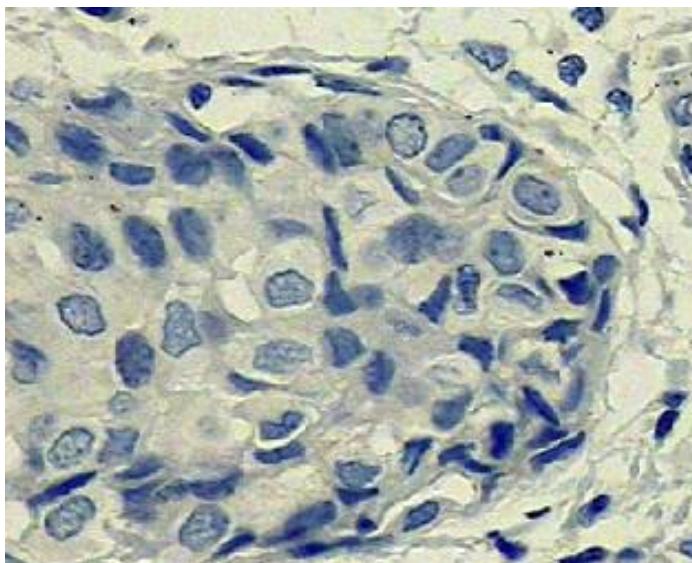


Figura 5 – Fotomicrografia de resultado imuno-histoquímico demonstrando resultado negativo para HER-2, no paciente número 31, com histopatológico compatível com carcinoma papilífero.
Fonte: Laboratório Bacchi (2012).

A imunorreatividade positiva para citoqueratina 19 foi identificada pela presença de precipitado castanho escuro no citoplasma das células do tecido tireóideo. Os casos positivos foram semiquantificados com base na relativa quantidade de células positivas em 1+ a 3+:

- fraca (+) ou focal: positividade em algumas células estimada em pelo menos 10% do total examinado;

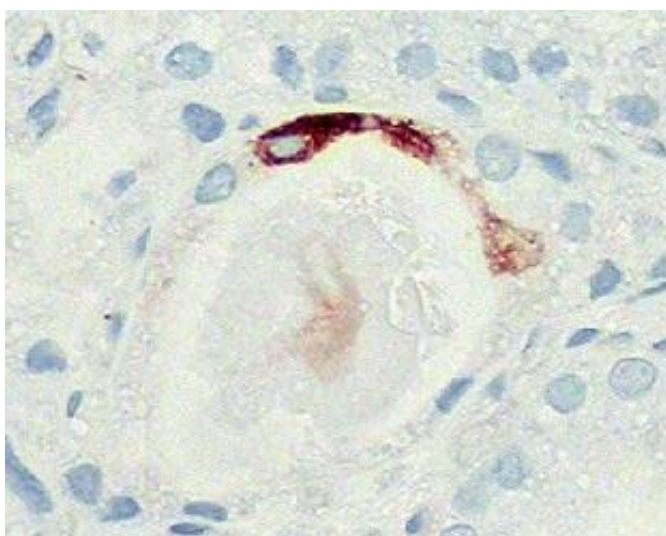


Figura 6 – Fotomicrografia de resultado imuno-histoquímico demonstrando positividade focal para Citoqueratina 19, no paciente número 30, com histopatológico compatível com Carcinoma Papilífero.
Fonte: Laboratório Bacchi (2012).

- moderada (++) : positividade de aproximadamente 11% a 50% das células;
- forte (+++) : positividade em grande número de células estimada em mais de 51%.

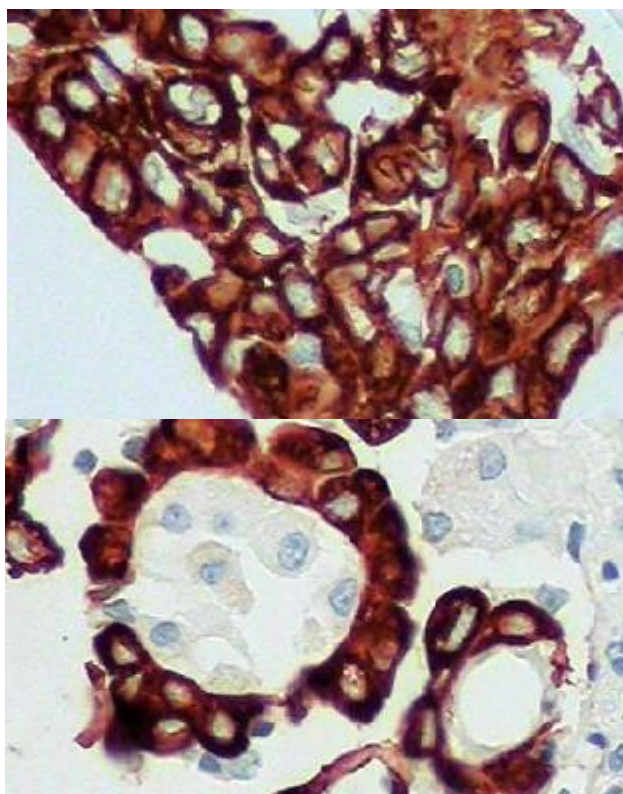


Figura 7 – Fotomicrografia de resultado imuno-histoquímico demonstrando resultado positivo +++ e ++ para Citoqueratina 19, na paciente número 31 com histopatológico compatível com Carcinoma Papilífero.
Fonte: Bacchi (2012).

3.2.3 Tratamento e análise dos dados

Para a análise estatística foram utilizados métodos descritivos e inferenciais. Na análise descritiva foram determinadas as estatísticas: Média, Desvio-Padrão para variáveis quantitativas. Quanto à análise inferencial foi aplicado o teste Exato de Fisher para avaliar a associação entre as variáveis categóricas. O nível de significância adotado foi de 5%, e o nível de confiança do teste de 95%.

Os dados foram armazenados na forma de banco de dados na planilha eletrônica Microsoft® Office Excel 2007, e analisados através do software Minitab, versão 14, juntamente com software R, versão 2.9.0.

4. RESULTADOS

A análise dos dados permitiu verificar que dos 34 pacientes estudados, 28 (82%) são do gênero feminino, e seis (18%) do gênero masculino, conforme Figura 8.

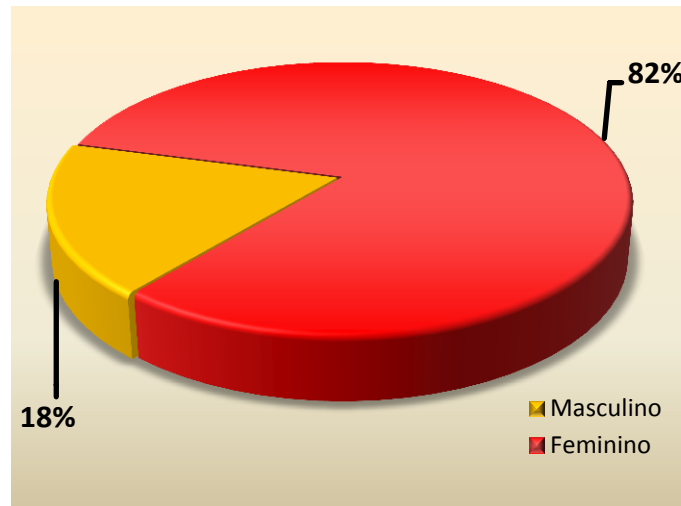


Figura 8: Distribuição dos pacientes quanto ao sexo. Fonte: Autor (2012).

A faixa etária dos pacientes variou de 25 a 76 anos, apresentado um número maior de pacientes entre 45 a 64 anos, com 44% do total. Seguidos da faixa etária de 25 a 44 anos (41%). Pacientes na faixa etária de 65 a 76 anos representam 15%. A média de idade foi de 47 ± 13 anos.

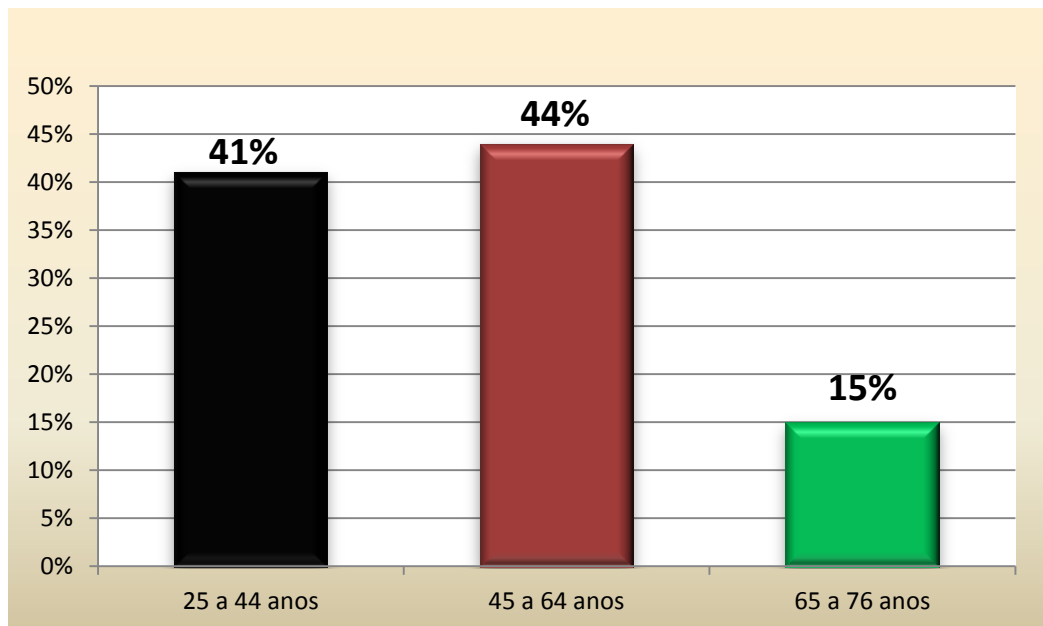


Figura 9: Distribuição quanto a faixa etária dos pacientes.
Fonte: Autor (2012).

Quanto à presença do marcador HER-2, nenhum caso foi detectado, sendo todos considerados negativos e não foi realizada análise estatística. Já quanto à CK 19, foi encontrado em várias intensidades, como se descreve a seguir:

Tabela 1: Cruzamento da variável CK19 (negativa, positiva focal e positiva) com a variável faixa etária, sexo e tipo histopatológico dos pacientes.

Variáveis (n = 34)	CK19						Total	p-valor*
	(-)		(F+)		(+)			
	f _i	%	f _i	%	f _i	%		
Faixa etária (anos)								
25 a 44	5	31	4	50	5	50	14	0,4229
45 a 64	8	50	2	25	5	50	15	
65 a 76	3	19	2	25	0	0	5	
	16		8		10		34	
Média ± DP	47 ± 13							
Sexo								
Masculino	2	13	4	50	0	0	6	0,02967
Feminino	14	88	4	50	10	100	28	
Tipo Histopatológico								
Adenoma Folicular	1	6	0	0	0	0	1	0,004642
Bócio Multinodular	6	38	2	25	1	10	9	
Bócio Adenomatoso	3	19	1	13	0	0	4	
Bócio Coloide	2	13	3	38	2	20	7	
Carcinoma Papilífero**	0	0	1	13	7	70	8	
Hiperplasia Nodular	4	25	1	13	0	0	5	

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste exato de Fisher;

** Estão inclusos os Microcarcinomas papilíferos.

Fonte: Autor, 2012

A Tabela 1 apresenta o cruzamento da variável CK19 com a variável faixa etária, sexo e tipo histopatológico. Os pacientes foram classificados em três grupos quanto à presença de CK 19: positivo focal (F+), negativo (-) e positivo (+). Dos 16 pacientes com CK negativo (-), 31% estão na faixa etária de 25 a 44 anos, 50% estão na faixa etária de 45 a 64 anos e 19% estão na faixa de 65 a 76 anos. Dos oito pacientes classificados com CK19 positivo focal, 50% estão na faixa etária de 25 a 44 anos, 25% estão na faixa etária de 45 a 64 anos e outros 25% estão na faixa de 65 a 76 anos. Já os pacientes classificados como CK 19 positivo, 50% estão na faixa etária de 25 a 44 anos e os outros 50% na faixa de 45 a 64 anos. Não se verificou

nenhuma associação significativa entre a presença de CK 19 e faixa etária, visto que o p-valor > 0.05 , ou seja, a faixa etária dos pacientes não influenciou quanto a presença de CK 19.

Desses 16 pacientes com CK19 negativo, 88% são do sexo feminino e 12% do sexo masculino. Dos oito com CK 19 positivo focal, 50% são sexo feminino e 50% do sexo masculino. Os casos de CK 19 positivos, 100% são do sexo feminino. Não se verificou uma associação significativa entre a variável gênero e a presença de CK 19.

Quanto ao tipo histopatológico, os pacientes classificados com CK 19 negativo, 6% foram diagnosticados com adenoma folicular, 38% com bócio multinodular, 19% com bócio adenomatoso, 13% com bócio colóide e 25% com hiperplasia nodular. Os pacientes classificados com CK 19 positivo focal, 25% foram diagnosticado com bócio multinodular, 13% com bócio adenomatoso, 38% com bócio colóide, 13% com carcinoma papilífero e 13% com hiperplasia nodular. Já os classificados com CK 19 positivo, 10% foram diagnosticados com bócio multinodular, 20% com bócio colóide e 70% com carcinoma papilífero. Verificou-se uma associação significativa entre a variável tipo histopatológico e a presença de CK 19, visto que o p-valor $< 0,05$, o que significa que o diagnóstico do tipo histopatológico é influenciado quanto a presença da variável CK 19.

A Tabela 2 apresenta a classificação dos pacientes quanto à intensidade da variável CK 19, que foi classificada em quatro grupos: negativa (-), fraca (+), moderada (++) e forte (+++). Ao cruzarmos a faixa etária com a variável intensidade da CK 19, vemos que 42% dos pacientes com idade entre 25 e 44 anos apresentaram intensidade de CK 19 fraca (+), o mesmo aconteceu com os pacientes com idades entre 45 e 64 anos. Dezesete por cento dos pacientes com idades entre 65 e 76 apresentaram intensidade de CK 19 fraca (+).

Quanto a intensidade de CK 19 moderada (++) , podemos observar na tabela 2 que 60% estão na faixa etária de 25 a 44 anos, 40% na faixa de 45 a 64 anos e um paciente apresentou intensidade forte (+++). Quando comparada com o gênero, 33% do sexo

masculino e 67% do sexo feminino apresentaram intensidade de CK 19 fraca. Os pacientes que apresentaram intensidade de CK 19 moderada e forte são todos do sexo feminino.

Tabela 2: Cruzamento da variável citoqueratina 19 – CK19 (fraca, moderada, forte e negativa) com a variável faixa etária, sexo e tipo histopatológico dos pacientes.

Variáveis (n = 34)	CK19								Total	p-valor
	Fraca (+)		Moderada (++)		Forte (+++)		Negativo (-)			
	f _i	%	f _i	%	f _i	%	f _i	%		
Faixa Etária										
25 a 44	5	42	3	60	1	100	5	31	14	0,8769*
45 a 64	5	42	2	40	0	0	8	50	15	
65 a 76	2	17	0	0	0	0	3	19	5	
Total	12		5		1		16		34	
Média ± DP	47 ± 13									
Sexo										
Masculino	4	33	0	0	0	0	2	13	6	0,3935*
Feminino	8	67	5	100	1	100	14	88	28	
	12		5		1		16		34	
Tipo Histopatológico										
Adenoma Folicular	0	0	0	0	0	0	1	6	1	0,088*
Bócio Multinodular	2	17	1	20	0	0	6	38	9	
Bócio Adenomatoso	1	8	0	0	0	0	3	19	4	
Bócio Coloide	4	33	1	20	0	0	2	13	7	
Carcinoma Papilífero	4	33	3	60	1	100	0	0	8	
Hiperplasia Nodular	1	8	0	0	0	0	4	25	5	
	12		5		1		16		34	

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste exato de Fisher; ** Estão inclusos os microcarcinomas papilíferos. Fonte: Autor, (2012)

Quanto a variável tipo histopatológico, os pacientes classificados com intensidade CK 19 fraca (+), 17% foram diagnosticados com bócio multinodular, 8% com bócio adenomatoso, 33% com bócio coloide, 33% com carcinoma papilífero e 8% com Hiperplasia Nodular. Dos pacientes com intensidade CK 19 moderada (++) , 20% foram diagnosticados com bócio multinodular, 20% com bócio coloide e 60% com carcinoma papilífero. O paciente com intensidade de CK19 forte (+++) apresentou carcinoma papilífero. Não se verificou nenhuma associação significativa entre as variáveis da tabela 2 (p-valor > 0,05), o que significa que quando a variável CK19 é classificada quanto sua intensidade não é influenciada por nenhuma outra.

Tabela 3: Cruzamento da variável tipo histopatológico com a variável faixa etária e sexo dos pacientes.

Variáveis (n = 34)	Tipo Histopatológico												Total	P- valor*	
	Adenoma Folicular		Bócio Multinodular		Bócio Adenomatoso		Bócio Coloide		Carcinoma Papilífero		Hiperplasia Nodular				
	f _i	%	f _i	%	f _i	%	f _i	%	f _i	%	f _i	%			
Faixa etária															
25 a 44	0	0	2	22	1	25	4	57	4	50	3	60	14	0,2693	
45 a 64	0	0	6	67	1	25	2	29	4	50	2	40	15		
65 a 76	1	100	1	11	2	50	1	14	0	0	0	0	5		
Total	1		9		4		7		8		5		34		
Média ± DP	47 ± 13														
Sexo															
Masculino	0	0	2	22	1	25	2	29	1	13	0	0	6	0,8320	
Feminino	1	100	7	78	3	75	5	71	7	88	5	100	28		
	1		9		4		7		8		5		34		

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste exato de Fisher; Fonte: Autor (2012)

Podemos verificar na Tabela 3 que o paciente que apresentou adenoma folicular está na faixa etária de 65 a 76 anos e é do sexo feminino. Dos nove que apresentaram Bócio multinodular, 22% estão na faixa etária de 25 a 44 anos, 67% na faixa de 45 a 64 anos e 11% na faixa de 65 a 76 anos, sendo que 22% são do sexo masculino e 78% do sexo feminino. Os quatro pacientes que apresentaram bócio adenomatoso, um está na faixa etária de 25 a 44 anos e outro na faixa etária 45 a 64 anos, dois estão na faixa etária de 65 a 76 anos. Dos quatro pacientes, um é do sexo masculino e três do sexo feminino. Sete pacientes apresentaram bócio coloide, sendo que 57% estão na faixa etária de 25 a 44 anos, 29% na faixa etária de 45 a 64 anos e 14% na faixa etária de 65 a 76 anos, desses sete, 71% são do sexo feminino. Os pacientes que apresentaram carcinoma papilífero, 88% são sexo feminino e 13% do sexo masculino. Metade deles está na faixa de 25 a 44 anos e a outra metade na faixa de 45 a 64 anos. Todos os cinco que apresentaram hiperplasia nodular bócio são do sexo feminino, desses cinco 60% está faixa etária de 25 a 44 anos e 40% está na faixa de 45 a 64 anos. Não se verificou nenhuma associação significativa entre as variáveis da Tabela 3, visto que o p-valor > 0,05, o que significa que a faixa etária e o sexo não influenciaram o tipo histopatológico.

4. DISCUSSÃO

Quanto aos quesitos gênero, idade e tipo histopatológico os resultados apresentados mostram uma distribuição compatível com a literatura, que mostra uma prevalência de indivíduos do sexo feminino (82%) em relação ao masculino, uma idade média de 47 anos, com um número maior de pacientes na faixa de 45 a 64 anos (44%) seguidos da faixa etária de 25 a 44 anos (41%). Mostra também uma prevalência de doença benigna, sendo que os tipos histopatológicos benignos mais frequentes foram bócio multinodular (nove), bócio colóide (sete), hiperplasia nodular (cinco), bócio adenomatoso (quatro) e adenoma folicular (um). Quando se realizou a análise estatística, não se evidenciou relação entre a idade e o sexo e a presença dos marcadores, tampouco a faixa etária e o sexo influenciaram o tipo histopatológico.

Nesta casuística, os pacientes classificados com CK 19 positivo focal, 25% foram diagnosticados com bócio multinodular, 13% com bócio adenomatoso, 38% com bócio colóide, 13% com carcinoma papilífero e 13% com hiperplasia nodular.

Já os classificados com CK19 positivo ou fortemente positivo (+ a +++), 10% foram diagnosticados com bócio multinodular, 20% com bócio colóide e 70% com carcinoma papilífero. Verificou-se uma associação significativa entre a variável tipo histopatológico e a presença de CK 19, visto que o p-valor < 0,05, o que significa que o diagnóstico do tipo histopatológico é influenciado quanto a presença da variável CK 19.

Quanto aos Carcinomas Papilíferos da Tireóide (CPT) especificamente, dos oito casos estudados, sete apresentavam positividade moderada a forte (+ a +++), e um positividade focal. Dentre os que apresentaram positividade encontramos três casos que foram classificados como Microcarcinomas Papilíferos (MCP), ou seja, tumores menores que um centímetro de diâmetro, que habitualmente são encontrados associados a bócio multinodulares ou colóides, e que também são conhecidos na literatura como

“incidentalomas” (achados acidentais). Estes nódulos únicos raramente evoluem com metástases e, pelo tamanho, dificilmente são diagnosticados no pré-operatório. Devido ao bom prognóstico, não está indicado complementação do tratamento com Iodo 131 (ablação com iodo radioativo) para estes pacientes, que geralmente ficam curados com a cirurgia (DOUGALL e CAMARGO, 2007). Em nosso trabalho os nódulos tinham entre 0,3 e 0,4 cm de diâmetro e estavam associados, um a bócio coloide, e os outros a bócio multinodular. Todos os microcarcinomas papilíferos (MCP) apresentaram coloração positiva para CK 19 moderada a intensa (+ a +++), o que está compatível com dados publicados por ERKILIC, AYDIN E EMRAH (2002), que citaram a utilidade do marcador CK 19 na diferenciação de MCP e carcinomas papilíferos da tireoide (CPT) em meio a bócios multinodulares, informando que os MCP e CPT apresentam coloração mais intensa.

A positividade dos CPT quanto à CK 19 está de acordo com dados da literatura (SAHOO, *et al.*, 2001; ROSA, KANAMURA, CARVALHO, 2005). Porém foram observados positividade difusa também em um bócio multinodular e um bócio coloide, o que nos leva a aferir que a CK 19 não ocorre somente em carcinomas, mas está correlacionada estatisticamente a eles (p -valor= 0,004642) embora não lhes sejam exclusivos. A positividade focal ou ausente, em nosso estudo foi mais presente em tumores benignos, o que também está de acordo com o levantamento bibliográfico, onde diversos autores relatam a presença de CK19 no tecido tireoideano normal ou benigno de forma fraca e dispersa ou ausente (BALOCH, 1999; KRAGSTERMAN, *et al.*, 1999; ERKILIC, 2001; BEESLEY e MCLAREN, 2002; SAHOO, *et al.*, 2005). Estes e outros autores procuraram associar a presença de CK 19 à malignidade, porém esta afirmativa permanece controversa, pois apesar de ter uma sensibilidade que chega a 94,4% (WISEMAN, *et al.*, 2008), a especificidade deste marcador ainda resta baixa, em torno de 50% a 80%, o que nos leva a concluir que pode ser útil como marcador diagnóstico, porém com especificidade baixa.

Não existe, na literatura, um marcador molecular que tenha se mostrado eficiente isoladamente para diferenciar lesões benignas e malignas da tireoide, embora vários promissores tenham sido estudados, como por exemplo, telomerase, *HMGI* (Y), *HBME-1*, *FN-1*, *CITED-1*, *TPO*, *GAL-3*, *RASSF1*, *RAS*, *PTEN* e *CAVI* (FINLEY, *et al.*, 2004; CERUTTI, 2007). Sendo a carcinogênese um processo complexo e associado a múltiplas alterações genéticas, a identificação de um único marcador capaz de classificar todas as lesões com alta sensibilidade e especificidade é um grande desafio. Assim, sugere-se que a associação entre os marcadores possa aumentar a sensibilidade e a especificidade do método (CERUTTI, 2007).

Um dos modos mais usados atualmente em busca de novos “genes candidatos” são dos estudos chamados *microarrays*, onde se buscam entre tecidos genes candidatos presentes em amostras com cDNA a partir de RNAm (ESZLINGER, *et al.*, 2007). Estes genes codificariam proteínas que poderiam ser investigadas por outros métodos como imuno-histoquímica (IHQ) e reação de transcriptase reversa em tempo real (PCR-RT)).

WISEMAN, *et al.* (2008), em um estudo com corte de 100 tumores benignos e 99 tumores malignos da tireoide (Carcinomas Foliculares da Tireóide (CFT), CPT e carcinomas de células de hurtle) usando *tissue microarrays* encontraram CK 19 como o segundo marcador mais importante, atrás apenas de Galectina-3 (GAL-3). Outros marcadores dignos de nota foram Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Androgen Receptor, p16, Aurora-A, e HBME. Estes autores encontraram boa sensibilidade, mas especificidade limitada (54%) da CK 19 quando usada isoladamente.

Com o objetivo de identificar genes cuja diferença de expressão era constante em diferentes estudos tipo “*microarray*”, GRIFFITH, *et al.* (2006) reavaliaram as listas resultantes de 21 estudos publicados. Usando critérios de seleção bem definidos, eles identificaram 107 genes diferencialmente expressos e citados mais de uma vez, 18 genes

reportados pelo menos duas vezes e doze citados pelo menos quatro vezes. Os autores descrevem uma lista de 12 genes, 10 dos quais foram validados por metodologias que investigam mRNA e/ou proteína (PCR-RT e/ou IHQ e Elisa), e dentre estes está a CK 19, que segundo os autores poderá auxiliar no desenvolvimento de um painel de marcadores que terá suficiente sensibilidade e especificidade para diagnóstico dos tumores da tireoide.

Aqui no Brasil, DE MATOS, *et al* (2005) encontraram positividade para CK 19 em 72,6 % de CPT analisados (total de 84 casos) e 21% de carcinomas foliculares (38 casos). Eles sugerem adição de outros marcadores (HBME-1 e RET) para aumentar a sensibilidade deste método, sua sensibilidade e especificidade.

Através de nossa casuística e a revisão da literatura, verificamos que a forte e difusa positividade da CK 19 isoladamente não pode ser considerada diagnóstica de CPT, porém, quando presente em lesões tireoideanas, devem ser consideradas suspeitas, sendo necessário um estudo minucioso para o encontro de alterações nucleares por um patologista capacitado para concluir o diagnóstico. Assim, um exame objetivo como o estudo IHQ com o uso da CK 19 ainda não pode suplantiar o olhar criterioso de um patologista, mas pode auxiliá-lo para classificar adequadamente o tipo histopatológico do tumor examinado.

Quanto à presença da hiperexpressão do oncogene HER-2, não encontramos nenhum caso positivo nesta amostra. Podemos sugerir várias hipóteses para tal fato, como variações decorrentes dos clones dos anticorpos utilizados e das técnicas realizadas, mas, fazendo uma breve revisão da literatura encontramos algumas pistas que justificam esta ausência.

Em uma série realizada na Espanha, os autores examinaram 67 tumores tireoidianos (10 adenomas foliculares, 11 carcinomas foliculares, três carcinomas anaplásicos, 25 carcinomas papilares e 18 carcinomas medulares) e 16 metástases por imuno-histoquímica usando um método de recuperação antigênica para parafina e um anticorpo policlonal

específico contra a parte intracitoplasmática da proteína HER-2 (UTRILLA, *et al.*, 1999). Não encontraram expressão da oncoproteína HER-2 em adenomas foliculares, carcinomas foliculares e carcinomas anaplásicos, mas sim em 52% dos carcinomas papilíferos (membrana e padrão citoplasmático difuso) e em todos os carcinomas medulares (padrão citoplasmático granular). Eles sugeriram novos estudos para confirmar estes dados, porém não foi encontrada casuística com resultados semelhantes, como poderemos ver a seguir.

Em outra série realizada na Coreia (KIM, *et al.*, 2001), os autores coletaram 62 amostras com cânceres diferenciados e indiferenciados e 24 amostras de tumores benignos da tireóide. Todos os tumores foram estudados por imuno-histoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra PTEN, HER-2 e p53. Neste caso, a superexpressão de HER-2 foi observada em cânceres de tireóide (83,8%) com mais frequência do que em tumores benignos (16,7%).

Numa série de 55 tecidos normais e neoplásicos da tireóide (36 neoplasias) de 46 mulheres e 9 homens nos Estados Unidos, MONDY, *et al.* (2003) não encontraram significativa expressão imuno-histoquímica de HER-2, sugerindo que o marcador não seria útil em estudos com tecidos tireoidianos.

Numa série maior composta só de cânceres, de 103 casos de carcinomas diferenciados da tireoide (KREMSER, *et al.*, 2003) estudados na Áustria, com acompanhamento mínimo de oito anos e submetidos ao mesmo tratamento, HER-2/neu foi detectada por imuno-histoquímica em secções de tecidos tireoidianos fixados em formalina, embebidos em parafina, utilizando anticorpo monoclonal para oncoproteína Her-2/neu Ab-17. Na análise estatística, utilizando o teste de Mann-Whitney, U-teste e qui quadrado, a superexpressão de Her2/neu foi significativamente correlacionada com pior prognóstico. Os casos sem metástases a distância mostraram significativamente menos coloração citoplasmática do que aqueles cujos pacientes desenvolveram metástases neste acompanhamento. Os autores

sugerem o possível benefício do uso de *Herceptin*® (trastuzumab) associado ao iodo radioativo para estes casos mais agressivos de carcinoma tireoidiano.

HER-2 e a expressão do gene P65 foram investigadas pelo método da reação de transcriptase reversa em cadeia da polimerase (RT-PCR) em 30 carcinomas foliculares da tireóide e 20 adenomas foliculares (CZYZ, *et al.*, 2003). Quanto à presença de HER-2, sua expressão foi encontrada em 18 (90%) dos adenomas foliculares, mas não em cânceres. Os autores concluíram que a expressão de genes de HER-2 e P65 estão associadas com adenoma folicular, mas não com o carcinoma folicular da glândula tireóide. Em nossa casuística, só tivemos um caso de adenoma folicular, o que sugere que deveríamos investigar mais este tipo histológico para validar esta hipótese.

Para esclarecer a importância da KIT (tirosina quinase), EGFR e HER-2 no carcinoma da tireóide indiferenciado, a expressão destes receptores e de fosforilação de tirosina foi analisada por imuno-histoquímica em casos de carcinoma indiferenciados e carcinoma papilíferos da tireóide ressecados (MURAKAWA, *et al.*, 2005). Eles encontraram expressão de HER-2 fraca (10%), mas significativa, nos carcinomas indiferenciados, e sugerem um possível papel no desenvolvimento dos carcinomas indiferenciados, tumores raros (menos de 1% dos cânceres de tireóide) e muito agressivos, com alta mortalidade, o que não encontrado nesta casuística.

Também está descrito a presença de HER-2/neu em Carcinomas Medulares da Tireóide (CMT), tumores também muito agressivos e raros (menos de 2% dos cânceres da tireóide), acompanhados de hiperplasia de células C (ENSINGER, *et al.*, 2003). Os autores estudaram 21 casos e 29 controles, e a expressão de HER-2 nos casos de cânceres foi relacionada estatisticamente à presença de metástases linfonodais e estadiamento do tumor. Não foram encontrados este tipo de câncer nesta casuística.

O carcinoma papilífero foi o mais encontrado em nossa casuística, com 8 casos, mas não encontrou-se positividade para HER-2 em nenhum deles. No levantamento bibliográfico verificamos que os resultados são muito variáveis e conflitantes, embora sigam métodos semelhantes (IHQ, PCR-RT), utilizaram diferentes anticorpos monoclonais e números variados de tecidos e pacientes. Como a oncoproteína HER-2 está associada a fenótipos mais agressivos, que não são tão comuns nos cânceres da tireóide, seriam necessários maior número de amostras coletadas durante período de tempo maior (10 a 20 anos) para resultados mais fidedignos, priorizando principalmente os casos mais raros e agressivos.

Quanto à Citoqueratina 19 (CK19), mostrou-se útil no estudo dos Carcinomas Papilíferos da Tireóide (CPT), que são os mais frequentes mundialmente, chegando a 85% dos tumores malignos e 10% dos casos operados em nosso serviço, o que favorece sua presença em estudos de curta duração, como o realizado.

Para investigar mais a regulação do crescimento dos tireócitos, devemos criar modelos reproduzíveis onde fatores ambientais, agentes internos estimulantes do crescimento, herdados ou mutações genéticas acumuladas possam ser estudados separadamente e em combinação. Atualmente os pesquisadores procuram marcadores biológicos e genéticos para tentar elucidar esta questão. As maiores ou menores expressões destes marcadores vão nos dar as características biológicas das doenças tireoidianas mais comumente operadas em nossa região e daremos um novo passo no estudo desta doença, do tecido em direção à molécula e à genética.

CONCLUSÕES

Na casuística estudada não foram encontrados casos positivos ou mesmo traços do marcador HER-2, o que sugere que a incidência da presença deste marcador nos tipos histológicos provavelmente seja baixa, o que limita seu uso como fator diagnóstico ou prognóstico.

Quanto à Citoqueratina 19 (CK 19), foi encontrado em vários tipos histológicos, sendo expressa com maior intensidade na maioria dos Carcinomas Papilíferos da Tireoide estudados nesta casuística, realizada na Fundação Hospital Adriano Jorge, com correlação estatística. Estes dados concordam com a literatura estudada. Concluimos que a CK 19 pode ter utilidade como adjuvante ao exame histopatológico indicando, quando presente a possibilidade de se tratar de um Carcinoma Papilífero da Tireoide.

REFERÊNCIAS

ALDRED, M.A.; HUANG, Y.; LIYANARACHCHI, S. Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol*, v. 22, p. 3531-39, 2004.

ALEXANDER, E.K.; KENNEDY, G.C.; BALOCH, Z.W.; CIBAS, E.S.; CHUDOVA, D, DIGGANS, J; FRIEDMAN, L.; KLOOS, R.T.; LIVOLSI, V.A.; MANDEL, S.J.; RAAB, S.S.; ROSAI, J.; STEWARD, D.L.; WALSH, P.S.; WILDE, J.I.; ZEIGER, M.A.; LANMAN, R.B.; HAUGEN, B.R. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med*. June 25, 2012.

AWADA, A.; BOZOVIC-SPASOJEVIC, I.; CHOW, L. - New therapies in HER2-positive breast cancer: a major step towards a cure of the disease? *Cancer Treat Rev*. v. 38, n. 5, p. 494-504, fev. 2012.

BACCHI C. E. ET COLS. Manual de padronização de laudos histopatológicos da Sociedade Brasileira de Patologia. 2. ed, São Paulo; Editora AR, 1999.

_____.; CORPA, M.; SANTOS, P.P.; BACCHI, C.E.; CARVALHO, F.M. Estrogen receptor positive breast carcinomas in younger women are different from those of older women: A pathological and immunohistochemical study. *Breast*. Jan. 2010.

BALOCH Z.W.; LIVOLSI, V. A.; ASA, S. L.; ROSAI J.; MERINO, M. J.; RANDOLPH, G.; VIELH, P.; DEMAY, R. M.; SIDAWY, M. K.; FRABLE, W. J. - Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol* v. 36, p. 425–37, 2008.

BALOCH, Z. W. Differential expression of cytokeratins in follicular variant of papillary carcinoma: an immunohistochemical study and its diagnostic utility. *Human Pathol*, v. 30, p. 1166-71, 1999.

_____.; FLEISHER, S.; LIVOLSI, V.A.; GUPTA, P.K. Diagnosis of “follicular neoplasm”: a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*, v. 26, p. 41-4, 2002.

BALSEAGA, J.; ARTEAGA, C. L. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol*, v. 23, p. 2445-59, 2011.

BARBALHO, C. R.S.; MORAES, S. O. Guia para normatização de teses e dissertações – Manaus: UFAM, 2003.

BARDEN, CB; SHISTER, KW; ZHU, B. Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: Results of gene profiling. *Clin Cancer Res*, v. 9, p. 1792-1800, 2003.

BARTEK, J.; TAYLOR PAPADIMITRIOU, J.; MILLER, N.; MILLIS R. Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human tissues and tumors. *Int J Cancer*, v. 36, p. 299-306, 1985.

BARTOLAZZI, A.; GASBARRI, A.; PAPOTTI, M. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet*, v. 357, p. 1644-50, 2001.

BEESELEY, M. F.; MCLAREN, K. M. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology*, v. 41, p. 236-43, 2002.

BOTELHO J. B.; CATTEBEKE L. C. H.; CATTEBEKE T. M. H., ANJOS G. S.; LIMA, R. M., BARBOSA M. F., AGUIAR G. C. Histopathologie de 573 thyroïdectomies réalisées entre 1976 et 1998 Manaus - Brésil. *Revue Officielle de La Société Française D'ORL et de Chirurgie de La Face et Cou*. Paris, v. 66, n. 2, p. 47-9, 2001.

_____. Pathologie de la glande thyroïde. In: Botelho J. B., Gehanno P. *Otorhinolaryngologie et chirurgie cervico-faciale à l'usage des étudiants*. Paris, 2. ed, p. 61-9, 2002.

CASTRO, M. R.; GHARIB, H. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice, and pitfalls. *Endocr Pract*, v.9, p. 128-36, 2003.

CATTEBEKE, L. C. H.; DE SOUZA, R. C. Estudo das indicações e resultados dos bócijs operados na Fundação Hospital Adriano Jorge em Manaus – AM. In: *INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS PROFIC 3*, 2007.

CERUTTI, J. M. Nódulos com Diagnóstico de Padrão Folicular: Marcadores Biológicos São o Futuro? *Arq. Bras. Endocrinol Metab*, v. 51, n. 5, p. 832-43, 2007.

_____; DELCELO, R.; AMADEI, M. J. A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J Clin Invest*, v. 113, n. 8, p. 1234-42, 2004.

_____.; LATINI, F. R.; NAKABASHI, C.; DELCELO, R.; ANDRADE, V. P.; AMADEI, M. J.; MACIEL, R. M.; HOJAJI, F. C.; HOLLIS, D.; SHOEMAKER, J.; RIGGINS, G.J. Diagnosis of suspicious thyroid nodules using four protein biomarkers. *Clin Cancer Res*, v. 12, p. 3311–18, 2006.

CHEN, K. T.; LIN, J. D.; CHAO, T. C. Identifying differentially expressed genes associated with metastasis of follicular thyroid cancer by cDNA expression array. *Thyroid*, v. 11, p. 41-46, 2001.

CIBAS, E.S.; ALI, S.Z. The Bethesda System for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid*, v. 19, p. 1159-65, 2009.

CURADO, M.P., EDWARDS B., SHIN H. R., STORM H., FERLAY J., HEANUE M., et al., editors. Cancer incidence in five continents, Lyon, IARC, 2007, v. 9.

CZYŻ, W.; BALCERCZAK, E.; RUDOWICZ, M.; NIEWIADOMSKA, H.; PASIEKA, Z.; KUZDAK, K.; MIROWSKI, M. Expression of C-ERBB2 and P65 genes and their protein products in follicular neoplasms of thyroid gland. *Folia Histochem Cytobiol*, v. 41, n. 2, p. 91-5, 2003.

DAVIES L.; WELCH HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA*, n. 295, p. 2164–7, 2006.

DE GROOT, L.J.: Radiation and thyroid cancer. *Proc. Inst. Med. Chicago*, v. 31, p. 95, 1976.

DE MATOS, P. S.; FERREIRA, A. P.; DE OLIVEIRA.; FACURI, F.; ASSUMPCÃO, L. V.; METZE, K. & WARD; L. S. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*, v. 47, p. 391–401, 2005.

DELANGE, F.; BÜRGI, H. Iodine deficiency disorders in Europe. *Bull W.H.O.*, v. 67, p. 317, 1989.

DOUGALL, R. & CAMARGO, C. A. Treatment of Micropapillary Carcinoma of the Thyroid: Where Do We Draw the Line? *Thyroid*, v. 17, n. 11, p 1-2, 2007.

ECCLES, S. A. The role of *c-erbB-2/HER2/neu* in breast cancer progression and metastasis - *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 6, n. 4, October, 2001.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. – Câncer de Mama: Marcadores Tumoriais (revisão da Literatura). *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001.

ENSINGER, C.; PROMMEGGER, R.; KENDLER, D.; GABRIEL, M.; SPIZZO, G.; MIKUZ, G.; KREMSER, R. Her2/neu expression in C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinomas, v. 23, n. 3B, p. 2241-3, may-june 2003.

ERKILIC, S.; AYDIN, A.; EMRAH, K. Diagnostic utility of cytokeratin 19 expression in multinodular goiter with papillary areas and papillary carcinoma of thyroid. *Endocr Pathol*, v. 13, n. 3, p. 207-11, 2002.

ESZLINGER, M.; KROHN, K.; KUKULSKA, A. JARZA, B. E PASCHKE, R. Perspectives and Limitations of Microarray-Based Gene Expression Profiling of Thyroid Tumors . *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 3, p. 322–38, may 2007.

FINLEY, D; ARORA, N; ZHU, B; GALLAGHER, L; FAHEY, T. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, p. 3214–23, 2004.

_____; ZHU, B.; BARDEN, C.B; FAHET, TJ III. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Ann Surg*, v. 240, n 3, p. 425-37, 2004.

FONSECA, E.; NESLAND, J.M.; HOIE, J.; SOBRINHO-SIMÕES, M. Pattern of expression of intermediate cytokeratin filaments in the thyroid gland: an immunohistochemical study of simple and stratified epithelial type cytokeratins. *Virchows Arch* ;430(3):239–45, 1997.

_____; SOBRINHO-SIMÕES, M. - Diagnostic problems in differentiated carcinomas of the thyroid. *Path Res Pract*, v. 430, n. 3, p. 239–45, 1997.

GALANTI, M.R., SPAREN, P., KARLSSON, A., GRIMELIUS, L., EKBOM, A.: Is residence in area of endemic goiter a risk factor for thyroid cancer? *Int. J. Cancer*, v. 61, p. 615, 1995.

GHARIB, H; PAPINI, E. Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am*, v. 36, p. 707–35, 2007.

GIORDANO, TJ; KUICK, R; THOMAS, D. G. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: Distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutationspecific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene*, v. 24, p. 6646-56, 2005.

GIOVANELLA, L.; CERIANI, L.; GHIRLFO, A.; MAFFIOLI, M. Circulating cytokeratin 19 fragments in patients with benign nodules and carcinomas of the thyroid gland. *Int J Biol Markers*, vol. 23, n. 1, 2008.

GORETZKI, P. E.; SIMON, M.D.; DOTZENRATH, C.; SCHULTE, K. S.; RÖHER, H.; Growth Regulation of Thyroid and Thyroid Tumors in Humans. *World J. Surg*, v. 24, p. 913–22, 2000.

GRAF, H. Doença Nodular de Tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 48, n. 1, p. 93-100, 2004.

GRIFFITH, O.L.; MELCK, A.; JONES, S.; WISEMAN, S. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. *J Clin Oncol*, v. 24, n. 31, p. 5043–51, 2006.

HEDINGER, C. E. ; WILLIAMS, E.D. ; SOBIN, L. H. Histological typing of thyroid tumors. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Internacional histological classification of tumours. 2nd ed.: Berlin: Springer-Verlag, 1988, p. 5-6.

HIROKAWA, M.; CARNEY, J.A.; OHTSUKI, Y. Hyalinizing trabecular adenoma and papillary carcinoma of the thyroid gland express different cytokeratin patterns. *Am J Surg Pathol.*, vol. 24, n. 6, 2000.

HODGSON, N. C.; BUTTON, J.; SOLORZANO, C. C. Thyroid Cancer: Is the Incidence Still Increasing? *Annals of Surgical Oncology*, v. 11, n. 12, p. 1093–97, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde: Rio de Janeiro, *Inca*, 2011, 118p.

KIKUCHI, T; CARBONE, D. P. Proteomic analysis in lung cancer: challenges and opportunities. *Respirology*, v. 12, p. 22-8, 2007.

KIM, J. S; BAE, J. S.; KIM, K. H.; AHN, C.H.; OH, S. J.; JEON, H. M.; LIM, K.W., CHUN, C. S. - Clinical Analysis of PTEN, p53 and Her-2/neu Expressions in Thyroid Cancers. *Cancer Res Treat.*, v. 33, n. 5, p. 433-37, out. 2001.

KLUGBAUER, S., DEMIDCHIK, E.P., LENGFELDER, E., RABES, H.M.: Molecular analysis of new subtypes of ELE/RET rearrangements, their reciprocal transcripts and breakpoints in papillary carcinoma of children after Chernobyl. *Oncogene*, v. 16, p. 671, 1998.

KRAGSTERMAN, D.; GRIMELIUS, L.; WALLIN, G.; WERGA, P.; JOHANSSON, H. Cytokeratin 19 expression in papillary thyroid carcinoma. *Appl Immunohistochem. Molec Morphol*, v. 7, p. 181-5, 1999.

KREMSER, R.; OBRIST, P.; SPIZZO, G.; ERLER, H.; KENDLER, D.; KEMMLER, G.; MIKUZ, G.; ENSINGER, C. - Her2/neu overexpression in differentiated thyroid carcinomas predicts metastatic disease. *Virchows Arch.*, v. 442, n. 4, p. 322-8. abr. 2003.

MATSUO, S. E.; MARTINS, L.; LEONI, S. G.; HAJJAR, D.; RICARTE-FILHO, J. C.; EBINA, K. N.; KIMURA, E. T. Marcadores Biológicos de Tumores Tiroidianos. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol. 48, nº 1, p. 114-125 fev. 2004.

MIETTINEM, M.; KOVATICH, A.J.; KARKKAINEN, P. Keratin subsets in papillary and follicular thyroid lesions. A paraffin section analysis with diagnostic implications. *Virchows Arch*, v. 431, n. 6, p. 407-13, 1997.

MONDI, M.M.; RICH, R.; ITUARTE, .P; WONG, M.; BERGMAN, S; CLARK, O. H.; PERRIER, N. D. HER2 expression in thyroid tumors. *Am Surg*, v. 69, n. 12, p. 1100-3, dec. 2003.

MURAKAWA, T.; TSUDA, H.; TANIMOTO, T.; TANABE, T.; KITAHARA, S.; MATSUBARA, O. - Expression of KIT, EGFR, HER-2 and tyrosine phosphorylation in undifferentiated thyroid carcinoma: Implication for a new therapeutic approach *Pathol Int*, v. 55, n. 12, p. 757-65, dez. 2005.

NATURE REVIEWS. <http://2.bp.blogspot.com/-11QofMU-AbM/UJAFhI5cFI/AAAAAAAAAAts/may1-UpSsuI/s1600/nrd2039-i1.jpg> . 2006.

OLAYOYE, M. A. Update on HER-2 as a target for cancer therapy Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members - *Breast Cancer Res*, v. 3, p. 385-89, 2001.

PRASAD, M.; PELLEGGATA, N.; HUANG, Y.; NAGARAJA, H.; DE LA CHAPELLE, A.; KLOOS, R - Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol*, v. 18, p. 48-57, 2005.

REED, C. E.; GRAHAN, A.; HODA, R. S.; KHOOR, A.; GARRET-MAYER, E.; WALLACE, M. B.; MITAS, M. A simple two-gene prognostic model for adenocarcinoma of the lung *J Thorac Cardiovasc Surg*; v. 135, p. 627-34, 2008.

ROSA, M. P.; KANAMURA, C. T.; CARVALHO, M. B. Expressão da Galectina 3 e Citoqueratina 19 nas neoplasias epiteliais da Glândula tireóide e correlação histopatológica. *J Bras Patol Med La*, v. 41, n. 1, p. 61-70, 2005.

SAHOO, S.; HODA, S. A.; ROSAI, J.; DELELLIS, R. A. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution. *Am. J. Clin. Pathol*, v. 116, p. 696-702, 2001.

SILVA, D. M.; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E.G. Marcadores Moleculares associados ao Câncer de Mama não metastático - *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 1, p. 39-48, 2002

STUDER H.; GERBER H.; ZBAEREN J.; PETER H, J. Histomorphological and immunohistochemical evidence that human nodular goiters grow by episodic replication of multiple clusters of thyroid follicular cells. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 75, n. 4, p. 1151-58, 1992.

UTRILLA, J.C.; MARTÍN-LACAVE, I.; SAN MARTÍN, M. V.; FERNÁNDEZ-SANTOS, J. M.; GALERA-DAVIDSON, H. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in human thyroid tumors. *Histopathology*, v. 34, n. 1, p. 60-5, jan. 1999.

WEBER, F.; SHEN, L.; ALDRED, M. A.- Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a 3-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 90, p. 2512-21, 2005.

WOLFF, A. C. editor *et al.* American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clinical Oncology*, v. 25, n. 1, January 2007.

ANEXOS

Anexo A - TERMO DE CIÊNCIA E CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título do Estudo: **A EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO MARCADOR TUMORAL CITOQUERATINA 19 E DA PROTEÍNA C-ERBB2 NOS BÓCIOS OPERADOS EM MANAUS - AM**

Justificativa e o problema de saúde a ser estudado: A tireóide está localizada na região anterior do pescoço. Esta glândula produz o hormônio tireoideano, o qual controla a taxa metabólica (velocidade das funções químicas do organismo). Alguns problemas que afetam a tireóide também podem fazer com que ela aumente de volume, uma condição denominada bócio. **O tratamento Cirúrgico se impõe quando se esgotaram todas as tentativas de tratamento clínico e o crescimento da tireóide podem levar a riscos de vida ao paciente.**

Depois da retirada parcial ou total de sua tireóide esta peça cirúrgica (também conhecida como biópsia) será examinada por patologistas experientes que dirá qual foi o diagnóstico final, se uma doença benigna ou maligna acometeu a sua tireóide.

Solicitamos que, **DEPOIS** de fechado o diagnóstico histopatológico (a chamada BIÓPSIA), e que esclarecerá que tipo de doença acometeu a sua tireóide e que justificou a cirurgia, ou seja, se foi doença **BENIGNA** ou **MALIGNA**, possamos usar blocos em parafina de Bócios **BENIGNOS** para um exame imunohistoquímico, que seria um tipo de biópsia **MAIS APROFUNDADA**. Informamos que este trabalho **não vai alterar de nenhuma forma a condução do seu tratamento nem o tipo de medicação que você tomará.**

Objetivos do Estudo: **O objetivo desse trabalho é permitir uma exata identificação das expressões maiores ou menores dos marcadores de diferenciação tumoral CITOQUERATINA 19 E C-ERBB2 em bócios operados na cidade de Manaus- AM**

Benefícios do Estudo: Pretende-se ao final da execução do projeto, ter material de análise que permita aos pesquisadores a presença ou não de marcador de malignidade (Citoqueratina 19) ou gem DE MENBRANA (C-ERBB2) em bócios operados no Amazonas.

Riscos associados ao estudo: Por se tratar de estudo de levantamento de dados já coletados do paciente, o presente estudo não apresenta riscos ao paciente.

Confidencialidade: Serão mantidos sob sigilo absoluto a identidade dos sujeitos da pesquisa e os dados obtidos através desse estudo. Informo também que todas as informações dos participantes serão utilizadas apenas para fins do presente estudo.

Acompanhamento assistencial: Os pacientes participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, podendo entrar em contato com Dr. Lesemky Cattebeke, Telefone (92) 3234 9464 ou por email: cattebeke@uol.com.br .

Autonomia, voluntariedade e retirada do estudo: O participante tem autonomia para decidir participar ou não do estudo, como também pode se retirar do mesmo, sem a necessidade de justificar esse gesto e sem qualquer prejuízo ao seu tratamento. Também tem o direito de fazer qualquer pergunta sobre o estudo em qualquer fase de execução do mesmo.

Formas de ressarcimento e indenização: O pesquisador, a Fundação Hospital Adriano Jorge ficará responsável pela assistência integral, inclusive indenizatória aos participantes, quando esses sofrerem danos a sua saúde em decorrência do presente estudo, o que, devido a natureza do trabalho, não acontecerá.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo:

Assinatura do participante

RG:

Assinatura do pesquisador ou colaborador

Manaus

(AM),

____/____/____

Anexo B - QUESTIONÁRIO PADRÃO**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS****IDENTIFICAÇÃO**

Nome:

Idade: Telefone:

DIAGNÓSTICO PRÉ OPERATÓRIO:.....Início dos Sintomas: - de 1 ano 1 a 3 anos 4 a 8 anos + de 9 anosPrimeiro diagnóstico: - de 1 ano 1 a 3 anos 4 a 8 anos**HISTORIA SOCIAL:**

1) Origem:

 Zona urbana Capital Interior Zona rural

2) Base alimentar por semana:

Carne vermelha: 0 – 2X 3 - 5X todos os diasPeixe: 0 – 2X 3 - 5X todos os diasFarinha de mandioca/ mandioca: 0 – 2X 3 - 5X todos os diasLegumes: 0 – 2X 3 - 5X todos os dias.**HISTORIA FAMILIAR:** Casos de bócio na família.Antecedentes familiares de bócio: 1^o. grau 2^o. grau 3^o. grauCarcinoma de tireóide na família: 1^o. grau 2^o. grau 3^o. grau Sem antecedentes conhecidos.**EXAMES SOLICITADOS (específicos): data**TSH: elevado normal baixoT3: elevado normal baixoT4: elevado normal baixoT4 L: elevado normal baixo**CINTILOGRAFIA:** sim Não Nódulo hipocaptante Nódulo hipercaptante

Outros:

Captação:

Peso estimado:

ULTRASSONOGRFIA: Bócio uninodular Lobo esquerdo Lobo direito Istmo Bócio multinodular Lobo esquerdo Lobo direito IstmoDiâmetro total: 0 a 2 cm 2 a 4 cm + de 4 cm

Classificação: Tipo I Tipo II Tipo III Tipo IV
 Diâmetro estimado:

RESUMO DO LAUDO:

PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA:

Positivo Negativo Material insuficiente

Laudo Resumido:.....

EXAME HISTOPATOLÓGICO:

Benigno Maligno Inconclusivo

Benigno:

bócio colóide adenoma papilífero adenoma folicular

Outros:

Exame imunohistoquímico:

Expressão de WWOX

Porcentagem

0 ausente

1+ fracamente positiva ou em menos de 10% do material examinado

2+ moderadamente positiva ou de 11 a 50% do material examinado

3+ fortemente positiva – mais de 51% de positividade do material examinado

Intensidade

0 ausente

1+ fracamente positiva

2+ moderadamente positiva

3+ fortemente positiva

Expressão de Citoqueratina 19 (CK 19)

0 ausente

1+ fracamente positiva ou em menos de 10% do material examinado



2+ moderadamente positiva ou de 11 a 50% do material examinado

3+ fortemente positiva – mais de 51% de positividade do material examinado

Assinatura do pesquisador

Data: _____/_____/_____

ANEXO C. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

 <p>Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Adriano Jorge</p>	<h3>Comitê de Ética em Pesquisa</h3> <h3>Fundação Hospital Adriano Jorge</h3>	
		FR- 474116
<p>PARECER DO PROCESSO Nº. 031/11 SEGUNDA (2ª) VIA</p>		
<p>Título do Projeto: A expressão imunoistoquímica do marcador tumoral citoqueratina 19 e da proteína C-erbB2 em bócios operados em Manaus –AM.</p>		
<p>Pesquisador Responsável: Lesemky Carlile Herculano Cattebeke.</p>		
<p>Data da Versão: 27.10.2011</p>	<p>CAAE (SISNEP): 0037.0.193.000-11</p>	<p>Data da Reunião: 01.12.2011</p>
<p>Grupo e Área Temática (Classificação utilizada pela CONEP): GRUPO III</p>		
<p>Objetivo Geral do Projeto: Verificar a expressão da citoqueratina 19 e do receptor C-erbB2 nos bócios de indivíduos operados em Manaus.</p>		
<p>Comentários do CEP/FHAJ</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Todos os documentos apresentam-se em conformidade com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. 		
<p>Observações:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Qualquer proposta de modificação no projeto original (emenda) deve ser apresentada ao CEP juntamente com a justificativa que a motivou, para gerar outro protocolo de pesquisa; ✓ Disponibilizar, a este CEP, relatório final da pesquisa, tão logo a mesma seja finalizada. 		
<p>Parecer do CEP/FHAJ: Projeto Aprovado.</p>	<p>Data da Emissão do Parecer: 08 de dezembro de 2011.</p> <p>Data da Emissão da 2ª Via: 29 de Novembro de 2012.</p>	<p>CEP/FHAJ:  Elton Araújo da Silva Coordenador do CEP/FHAJ</p>
<p>Av. Carvalho Leal, 1778 - Cachoeirinha CEP 69065-001 Manaus (AM) Tel./ Fax: (92) 3214-9104 e-mail: cep_fhaj@hotmail.com</p>		