



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

RODOLFO FAGIONATO DE FREITAS

A EXPRESSÃO DA CICLINA D1 NOS BÓCIOS SUBMETIDOS A
TIREOIDECTOMIAS EM MANAUS/AM

Manaus
2012

RODOLFO FAGIONATO DE FREITAS

**A EXPRESSÃO DA CICLINA D1 NOS BÓCIOS SUBMETIDOS A
TIREOIDECTOMIAS EM MANAUS/AM**

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

Orientador: Prof. LD João Bosco Lopes Botelho

**Manaus
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Freitas, Rodolfo Fagionato de.

F866 A expressão da ciclina D1 nos bócios submetidos a tireoidectomias em Manaus/AM / Rodolfo Fagionato de Freitas. - Manaus: UFAM, 2012.

57 f. : il.

Orientador: João Bosco Lopes Botelho, LD

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

1. Bócios - Expressão imunohistoquímica Ciclina D1. 2. Tireoidectomias - Manaus. 3. Bócios - Manaus. I. Título.

CDU - 616.441-006.5(811.3)

RODOLFO FAGIONATO DE FREITAS

**A EXPRESSÃO DA CICLINA D1 NOS BÓCIOS SUBMETIDOS A
TIREOIDECTOMIAS EM MANAUS/AM**

Aprovado em 13 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. LD João Bosco Lopes Botelho – Orientador

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Euler Esteves Ribeiro

Universidade Aberta da Terceira Idade UNATI/UEA

Dr. Cláudio do Carmo Chaves

Instituto de Oftalmologia de Manaus

Prof. Dr. Ozório José de Menezes Fonseca

Universidade do Federal do Amazonas

Prof. Dr. Manuel Neuzimar Pinheiro Junior

Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

A Deus, sobre todas as coisas. Pela capacidade que me dá de adquirir conhecimentos e de poder transmiti-los.

A minha esposa Cynthia, essa conquista é fruto do seu apoio e incentivo constantes. Obrigado pelo amor e pela amizade.

A minha filha Nicole, pela compreensão das incontáveis horas, noites e dias, debruçadas sobre esse trabalho. Perdão pela ausência. Agradeço a você pela percepção, pelo incentivo e, apesar de tão jovem, pela sua grande responsabilidade.

Irmãos, familiares e amigos: alguns de vocês estiveram mais próximos, outros mais distantes, mas sei que todos torceram por mim e estão felizes por mais essa vitória.

Aos meus pais (*in memoriam*):

Nada pode reparar a angústia da vossa perda, nada pode expressar a dor da vossa falta, nada pode lembrar a intensidade do vosso amor, dedico a vós, pai e mãe, todo o meu esforço, todas as minhas conquistas, tudo o que sou e o que serei. Onde quer que estejam, sempre vencerei em sua memória.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus por estar sempre comigo em todos os momentos e por ter me ajudado a chegar até aqui.

Ao Professor Dr. João Bosco Lopes Botelho, orientador do trabalho, pelos conhecimentos transmitidos desde o mestrado, pela disponibilidade para orientação e pela oportunidade de desenvolver este e outros trabalhos que me permitiram crescer profissionalmente e ingressar na carreira acadêmica.

Ao Professor Dr. Ozório José de Menezes Fonseca, pela fundamental contribuição na construção desta tese.

Ao Professores Dr. Spartaco Astolfi Filho, Dr. Edmar Vaz de Andrade, Dra. Cristina Maria Borborema, Dr. Guajarino de Araujo Filho e Valdir Florêncio da Veiga, pela ajuda e sugestões na elaboração do projeto de pesquisa que deu origem a este trabalho, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Nubiane dos Santos Pinon Freitas, secretária do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFAM, pela facilidade e profissionalismo na execução de suas tarefas.

À Gilmara Guimarães, pela estatística.

À Professora Suely Moraes, pela realização da ficha catalográfica e pela valiosa revisão do português.

Aos membros e suplentes da Banca examinadora pelas excelentes sugestões que contribuíram para um melhor norteamto da abrangência de conteúdo prático da tese.

Aos pacientes, sem os quais seria impossível a realização deste estudo, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os bóciós destacam-se entre as patologias hiperplásicas tireoidianas pela elevada prevalência na região Amazônica. Manaus, nas últimas décadas, recebe pacientes portadores de bócio oriundos dos estados do Pará até o Acre em busca do tratamento de suas patologias. Este trabalho avaliou a imunexpressão de ciclina D1 de forma qualitativa em peças cirúrgicas com o diagnóstico histopatológico de bócio de pacientes submetidos à tireoidectomia na cidade de Manaus/AM. Selecionados quarenta e um pacientes com diagnóstico histopatológico de bócio, e, a partir dos blocos de parafina da histopatologia, submetidos a análise imunohistoquímica da expressão da ciclina D1. Os dados foram analisados segundo a associação entre a expressão da ciclina D1 e o diagnóstico de bócio adotando-se o índice de significância estatística ($p < 0,05$) e o *odds ratio* (OR). Dos 41 pacientes, 36 (87,8%) eram mulheres, com média de idade de 48 anos. Vinte (48,8%) pacientes apresentaram positividade para a expressão de ciclina D1 e a correlação observada entre o diagnóstico histopatológico e os resultados para ciclina D1 foi positiva (Correlação de Pearson = 26,1%) para bóciós. A chance de um paciente feminino ter resultado positivo para ciclina D1 é 4,5 vezes maior do que em pacientes masculinos (OR = 4,5). Mas, mesmo que a maioria absoluta dos casos positivos para ciclina D1 seja do gênero feminino, a correlação estatística não se mostrou significativa para o gênero - teste Exato de Fisher (p -valor = 0,16). Comumente considerada como marcador de diferenciação celular nas lesões tireoidianas malignas, onde pode exercer uma função de multiplicação celular, este estudo mostrou que a ciclina D1 pode estar presente, também, em lesões hiperplásicas benignas, como os bóciós no Amazonas.

Palavras-chave: imuno-histoquímica; ciclina D1; bócio.

ABSTRACT

The goiters stand out among the hyperplastic thyroid pathologies by high prevalence in the Amazon region. Manaus, in recent decades, receives patients with goiter from the states of Pará to Acre in search of treatment of their pathologies. This work evaluated the immunoexpression of cyclin D1 in a qualitative way in surgical specimens with histopathologic diagnosis of goiter patients undergoing thyroidectomy in Manaus / AM. Forty-one selected patients with a histopathologic diagnosis of goiter, and from the paraffin blocks of histopathology, immunohistochemistry analysis submitted to the expression of cyclin D1. Data were analyzed according to the association between the expression of cyclin D1 and the diagnosis of goiter adopting the index of statistical significance ($p < 0.05$) and the odds ratio (OR). Of the 41 patients, 36 (87.8%) were women, with a mean age of 48 years. Twenty (48.8%) patients were positive for the expression of cyclin D1 and the observed correlation between histopathology and the results were positive for cyclin D1 (Pearson correlation = 26.1%) for goiters. The chance of a female patient have resulted positive for cyclin D1 is 4.5 times higher than in male patients (OR = 4.5). But even if the absolute majority of cases positive for cyclin D1 is female, a statistical correlation was not significant for the genre - Fisher exact test (p-value = 0.16). Commonly regarded as a marker of cell differentiation in malignant thyroid lesions, where may perform a function the cell multiplication, this study showed that cyclin D1 may be present also in benign hyperplastic lesions, such as goiters on Amazon.

Keywords: immunohistochemistry; cyclin D1; goiter.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Células coradas por CD1 nas lâminas positivas (castanho). 40
- Figura 2 - Células coradas por CD1 na segunda lâmina positiva (castanho)... 40
- Figura 3 - Células coradas com CD1 apresentando positividade (castanho)... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características epidemiológicas e clínicas dos 41 pacientes.	35
Tabela 2. Correlação entre o gênero e a faixa etária dos pacientes.	38
Tabela 3 - Correlação entre diagnóstico e gênero dos pacientes avaliados. ...	41
Tabela 4 - Correlação entre o exame anátomopatológico e a IHQ.	42
Tabela 5 - Relação entre o gênero e os resultados da Ciclina D1.	42
Tabela 6 - Correlação entre a faixa etária e a análise IHQ dos pacientes.	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição por gênero dos pacientes avaliados.	37
Gráfico 2 - Distribuição por faixa etária dos pacientes avaliados.	38
Gráfico 3 - Distribuição por diagnóstico dos pacientes avaliados.....	39
Gráfico 4 - Resultado da CD1 dos pacientes avaliados.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - anticorpo

CCND1 – gene

CD1 - ciclina D1

DNA - ácido desoxirribonucleico

Fase G0 - fase de quiescência

Fase G1 - intervalo entre a mitose que originou a célula e a fase S

Fase G2 - intervalo entre a fase S e a Mitose

Fase M - mitose

Fase S - fase de síntese do DNA

FHAJ - Fundação Hospital Adriano Jorge

Gal-3 - marcador

Graus C - graus Celsius

p27 - marcador

PAAF - punção aspirativa por agulha fina

pH - potencial hidrogeniônico

T3 - triiodotironina

T4 - tetraiodotironina ou tiroxina

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

IHQ - imunohistoquímico

TSH- hormônio estimulante da tiróide

CK19 – citoqueratina 19

TIR3 - atipias de significado indeterminado / lesão folicular de significado indeterminado

TIR4- suspeito de neoplasia folicular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivo específico	16
3 JUSTIFICATIVA	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1 História da tireoide.....	19
4.2 As limitações no diagnóstico citológico do bócio e do nódulo tireoidiano	23
4.3 O método da imunohistoquímica no diagnóstico citológico do bócio.....	24
4.4 O ciclo celular e a carcinogênese	25
4.5 As ciclinas	27
4.6 O bócio na Amazônia.....	29
5 PROPOSIÇÃO	31
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
6.1 Descrição da área de estudo	32
6.2 Amostra	32
6.3 Critérios de inclusão.....	32
6.4 Critérios de exclusão.....	32
6.5 Aspectos éticos	33
6.6 Análise histopatológica e imunohistoquímica.....	33
6.10 Análise dos resultados.....	33
6.11 Análise estatística dos dados	34
7 RESULTADOS	35
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

11 REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

O bócio, do ponto de vista clínico, representa qualquer aumento da glândula tireoide, não importando a etiologia ou a fisiopatologia, porém, do ponto de vista histopatológico, representa uma hipertrofia difusa ou localizada da glândula tireoide em consequência da hiperplasia das células foliculares (BOTELHO, 2000).

Os bócios podem ter várias causas: deficiência de iodo (bócio endêmico), falha genética das enzimas da hormoniogênese (bócio disormonogenético), drogas que inibem a utilização do iodo e alimentos bociogênicos. Pode ocorrer bócio, fisiologicamente, durante a gestação ou a puberdade, quando há profundas alterações hormonais (CABRAL, 2009).

Os bócios multinodulares são descritos como um aumento da glândula tireoide, difusamente heterogênea. A apresentação inicial poderá incluir um aumento difuso, e não tão raro nodularidade assimétrica. Inicialmente, a hiperplasia é eutireoidea; entretanto, com o crescente aumento de tamanho, podem ocorrer elevações de T3 e T4, e progredir gradualmente para o hipertireoidismo clínico (HERMUS; HUYSMANS, 1998).

Distribuídos principalmente em países subdesenvolvidos e em áreas bociogênicas, os bócios tem sua incidência relacionada principalmente com a baixa ingesta de iodo na alimentação. Acrescenta-se a este fato, uma peculiaridade dos povos amazônicos, como no Amazonas, o uso exagerado de farinha de mandioca, alimento bociogênico, rico em ácido cianídrico, reconhecido anti-tireoideo, que se transforma em tiocianato, após a ingesta, sob ação da enzima rodanase (BOTELHO, 2000).

Este trabalho busca melhorar o desempenho da imunohistoquímica de teste, a fim de reduzir o falso negativo e enviar com êxito para a cirurgia, todos os pacientes com lesões potencialmente benignas ou malignas, a fim de prever com quantidade ínfima de tecido o ponto de corte mais preditivo de benignidade ou malignidade no pré-operatório, auxiliando na decisão de radicalidade do tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar a expressão imunohistoquímica das relações entre a ciclina D1 e os bócios em Manaus/AM.

2.2 Objetivo específico

Avaliar a análise imuno-histoquímica da expressão da ciclina D1 e sua correlação com os bócios, comparando os achados ao da literatura.

3 JUSTIFICATIVA

Fischer S, ASA S. L, 2008, utilizaram métodos imuno-histoquímicos para avaliar a expressão da Ciclina D1 nas patologias tireoidianas; utilizando a técnica do complexo avidinabiotinapeptidase com antisoro monoclonal purificado de coelho contra a Ciclina D1.

Os cientistas serviram-se da análise de *Western blot* e coloração imuno-histoquímica, e a Ciclina D1 foi detectada com maior freqüência no citoplasma de doenças proliferativas da tireoide quando comparadas aos controles normais; e concluíram que a Ciclina D1 pode ter uma influência crescimento tumoral glandular.

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais, que propiciaram uma enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos tissulares ou celulares, e o advento da recuperação antigênica foram fatos marcantes na evolução da IHQ (WERNER, 2005; BODEY, 2002).

Desde a sua introdução, na década de 70, as publicações científicas com aplicações da IHQ em patologia cirúrgica aumentaram significativamente, expressando a posição que a IHQ ocupa em um laboratório de patologia cirúrgica, como técnica complementar na resolução de dúvidas diagnósticas formuladas nas lâminas coradas com coloração básica (WERNER, 2005; HIS, 2001).

Análises de ocupação do receptor androgênico em *loci* alvo de genes reguladores de relevância clínica demonstraram que a Ciclina D1 limita a residência no Receptor Androgênico após a estimulação hormonal. Supõe-se uma nova função para ciclina D1 em controlar resultados de transcrição hormônio-dependentes a partir da regulação dinâmica do fator de transcrição.

Dada a freqüência de alterações da ciclina D1 nas tumorações, o atual desafio é delinear os mecanismos moleculares pelos quais essa proteína controla a rede dos fatores de transcrição em doenças humanas (COMSTOCK et al, 2011).

A literatura é escassa quanto aos perfis IHQ de bócios benignos, sendo obscura sua utilização nesses casos. Tal fato, impede que achados citológicos (PAAF) inconclusivos ou suspeitos possam ser confirmados no pré-operatório desses doentes.

Estudar de maneira inédita tais perfis em uma área conhecidamente bociogênica, inaugura uma linha de pesquisa vanguardista mundial, e contribui sobremaneira com a literatura disponível.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 História da tireoide

A existência da glândula tireoide, como estrutura anatômica humana, foi descrita pela primeira vez no século I, por Cláudio Galeno. Somente no século XVI, Vesalius ofereceu maior informação descritiva e, mais recente, foi denominada tireoide (gr. Thyreo = escudo) por Wharton (BOTELHO, 2000).

Com freqüência, é possível identificar várias pinturas e esculturas oriundas tanto das civilizações mais antigas quanto da Europa Central, até o século XVIII, evidenciando homens e mulheres portadores do aumento de volume da glândula tireoide. A análise identificadora é baseada, exclusivamente, no cuidado tomado pelo artista para evidenciar o aumento de volume na região infra-hióidea e, em alguns casos, com clareza o delineamento do bócio. Porém, não existem registros que ofereçam sequer explicações dessas anomalias das formas do pescoço.

Na medida em que chamou a atenção dos artistas, parece claro supor que somente o fato de essas pessoas terem sido representadas de modo objetivo representa explícito sentido da realidade, diferente dos que não apresentavam as alterações (BOTELHO, 2004).

A hiperplasia da tireoide é uma condição patológica comum, acometendo cerca de 5% de qualquer população. Embora existam várias formas histológicas, todas iniciam com hiperplasia celular difusa dos ácinos tireoideos. Quando leva ao aumento do volume da glândula, denomina-se bócio. A presença de bócio nem sempre significa alteração funcional da glândula (CABRAL, 2009).

Os bócios caracterizados como aumento de volume da glândula tireoide, são relatados há milênios pelo homem. Já em 2000 a.C. notava-se a sua representação em baixos relevos da região do alto rio Nilo, os registros egípcios constituem as mais

antigas comprovações da existência das doenças da tireoide.

Apesar de não ser citada como estrutura visceral, é possível identificar quanto o aumento do tamanho da glândula, avolumando o pescoço anteriormente, era importante na estrutura social.

Um dos primeiros médicos chineses que identificou o bócio foi Chang Hua, no antigo Império, na época dos Han, entre os anos 206 e 220 d.C. No seu livro *Pó-wu-che* ou *História Natural*, preconizou o tratamento com mexilhões. No médio Império, entre os anos 587-617, durante a dinastia dos Suei, o médico Suen Sseumiau (581-682 d.C.), na sua obra *Mil Receitas Valiosas* descreveu o bócio como doença provocada pela carência alimentar.

No século XI, Albucasis teria executado a primeira cirurgia bem sucedida para exérese da tireoide. Frugardi fez a primeira referência à extração cirúrgica de um bócio. A primeira menção a um bócio multinodular foi feita no Tratado de Medicina de Rueff, em 1556. O primeiro relato cirúrgico de uma tireoidectomia coube a Desault, em 1791.

No século XIX houve uma popularização das cirurgias da glândula da tireoide, principalmente por parte de alemães e austríacos, como Mandl, Gunther e Bruberger. Entretanto, nessa época, não havia unanimidade sobre a efetividade e segurança do tratamento cirúrgico dos bócios devido à morbimortalidade frequentemente observada.

Samuel Gross, o mais famoso cirurgião norte-americano daquela época, afirmava em 1866: “Pode a glândula tireoide, quando aumentada, ser removida com uma razoável esperança de se salvar o paciente? A experiência, enfaticamente, responde não!” Até mesmo Bilroth, em 1883, contabilizava 20 tireoidectomias, com 40% de mortalidade intra-operatória.

Foi nesse cenário acima descrito que surgiu o pai da cirurgia tireoidiana, estabelecendo as bases técnicas que são empregadas até hoje com poucas alterações. Emil Teodor Kocher (1841-1917) foi o mais brilhante discípulo de Bilroth. Nascido em Berna, na Suíça, ocupou a Cátedra de Cirurgia com 31 anos. Em 1898,

publicou sua experiência inicial com 600 tireoidectomias, notando uma redução da mortalidade de 30 para 5%.

Em 1907, publicou um livro sobre cirurgia de tireoide baseado em sua experiência de 3.333 cirurgias. Em 1909, foi o primeiro cirurgião a receber o prêmio Nobel de Medicina (KOWALSKI, 2005).

As patologias da glândula tireoide são muitas e os tumores da tireoide representam a mais frequente neoplasia no âmbito do sistema endócrino e constituem o objeto de estudo de vários ramos da medicina como a endocrinologia, a oncologia, o diagnóstico por imagem, a cirurgia e a anatomia patológica. Só nos Estados Unidos da América são diagnosticados 20.000 novos casos por ano e, destes, cerca de 1% são malignos com uma taxa de mortalidade que ultrapassa 10% (STEWART; KLEIHUES, 2003; RIES, 2005).

O amplo espectro da patologia tiroidiana compreende: forma autoimune como a tireoidite de Hashimoto e a doença de Basedow; lesões proliferativas do tipo benigno como o bócio nodular e o adenoma folicular; neoplasias malignas de forma bem diferenciada como o carcinoma papilífero e o folicular e formas menos diferenciadas como o carcinoma pouco diferenciado e os anaplásicos.

Da mesma forma, a conduta cirúrgico-farmacológica e o seguimento dos pacientes portadores das diversas patologias tireoideas é claramente diversificado.

Morfologicamente, os bócios podem ser difusos ou nodulares, sendo que, os últimos podem ser uni ou multinodulares e, o critério funcional classifica-os em bócios com eutireoidismo, isto é, com a função hormonal preservada (atóxicos ou simples), bócios com hipotireoidismo e bócios com hipertireoidismo (tóxicos), conforme as manifestações clínicas de hipo ou hiperatividade hormonal, respectivamente.

Histologicamente, os bócios representam uma hipertrofia do tecido tireoidiano em consequência da hiperplasia das células foliculares.

Dividem-se em bócios endêmicos, esporádicos, não nodular, multinodular, multinodular hiperfuncionante, mergulhante ou torácico ou mediastínico, e bócios de

grande volume (BOTELHO, 1981).

Nos últimos 5 anos muitas publicações científicas testemunharam o esforço comum multidisciplinar visando a formulação de diretrizes para o tratamento das neoplasias benignas e malignas da tireoide também à luz da moderna prática de Medicina Baseada em Evidências para uma correta gestão sócio-econômica e das modernas técnicas de diagnóstico e terapia.

A Medicina Baseada em Evidências não é simplesmente o que deriva da pesquisa, mas, principalmente, a partir de estudos clínicos controlados e guiados por prática clínica. O enorme progresso nas pesquisas biomédicas põe hoje à disposição novas informações sobre os mecanismos bioquímicos da carcinogênese.

Hoje é imperativo basear a própria decisão, diagnóstica e terapêutica, sobre a avaliação crítica dos resultados disponíveis na literatura científica. No campo anátomo-patológico o simples diagnóstico morfológico de uma lesão neoplásica deve ser acompanhado por investigações auxiliares relativas a novos marcadores.

O desenvolvimento de novos fármacos, sobretudo da terapia “*target*” (“alvo”), torna também necessário a identificação do perfil gênico e fenotípico da lesão específica para otimizar o tratamento cirúrgico-farmacológico.

A manifestação clínica de início de disfunção da tiróide é muitas vezes acompanhada pelo aparecimento de um nódulo da tiróide. Estima-se que 4-8% da população tem pelo menos um nódulo identificado à palpação, e esta proporção aumenta consideravelmente se levarmos em conta os dados que emergem de exames de ultrassom incidentais (eco carótida ou parótida) e ainda mais se analisarmos provas forenses que destacam a presença em 50% dos relatórios de necropsia.

Apenas uma pequena percentagem (5%) dos nódulos esconde, no entanto, lesões malignas e é, portanto, fundamental identificar, e sobretudo, caracterizar os nódulos da tireoide ainda na fase pré-operatória (BURGESS, 2006).

Existe atualmente um algoritmo sistemático para a avaliação dos nódulos da tireoide, baseado na história clínica, no exame objetivo local, na medida do hormônio

TSH, na ultrassonografia do pescoço e aspiração com agulha fina (PAAF), com e sem a orientação do ultrassom.

A PAAF tem certamente um papel central na gestão de pacientes com nódulos da tireoide como um procedimento minimamente invasivo, e particularmente útil para determinar a extensão da abordagem cirúrgica (lobectomia ou tireoidectomia total).

4.2 As limitações no diagnóstico citológico do bócio ou do nódulo tireoidiano

Para diferentes patologistas conforme citado por Fischer (2008), a maioria dos tumores de tireóide, é confrontado com lesões da tireóide, em que a distinção entre benignos e malignos, pode ser bastante sutil. A decisão favorecendo um, ou outro, tem consequências clínicas que implicam em diferentes modalidades de tratamento. Por um lado, existe a necessidade, de que seja evitado o tratamento excessivo e geração de desconforto psicológico para o paciente.

Quanto à citologia, apresenta limitações diagnósticas relacionadas com a natureza da amostra; sendo por isso que, o sistema de classificação dos critérios encontra-se em contínua evolução, com base na avaliação do risco de malignidade (RM) e necessitando sempre, da aplicação de novos marcadores moleculares de suporte ao diagnóstico morfológico.

Na atual classificação Bethesda (National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference) existe ainda, segundo Ali (2010), uma zona cinzenta no diagnóstico citológico da tireóide constituída das categorias diagnósticas de TIR3 e TIR4.

Por esta razão, a abordagem destes tumores de diagnóstico difícil deve incluir técnicas auxiliares, imunohistoquímica e molecular de perfis, que podem melhorar o padrão de avaliação morfológica, tanto em peças cirúrgicas e em amostras obtidas por citologia aspirativa com agulha fina (REZK; KHAN, 2005; SALVATORE et al, 2004).

Nestas categorias é ainda mais importante individualizar novos marcadores que nos permitam definir melhor o diagnóstico citológico e distinguir entre lesões malignas e benignas para evitar-se uma cirurgia em dois tempos com aumento das despesas de saúde e com geração maior de impacto para o paciente. Até os dias atuais, um diagnóstico citológico de TIR3 e TIR4 de acordo com Ali (2010), determina uma clara indicação de cirurgia com lobectomia /lobotomia.

Para a autora antes nominada, células foliculares dispostas em grupos lotados e/ou micro-folículos no mundo atual são hoje diagnosticadas em citologia, como TIR3 ou “neoplasia folicular, ou suspeito de neoplasia folicular”. Refere ainda , que as lesões histológicas diagnosticadas citologicamente como “*indeterminadas*”, mostra simples nódulos hiperplásicos de bócio adenomatoso ou proliferações benignas como o adenoma folicular, mas podem também esconder uma variante folicular do carcinoma papilífero, ou carcinomas foliculares.

Estatisticamente nesta categoria diagnóstica “*indeterminada*”, o MR (Risco de Malignidade) = 20% significa que uma lesão em cinco, acaba por ser maligna e, por conseguinte, requer radicalização do ato cirúrgico com cirurgia totalizadora adicional. (ALI, 2010).

Células agrupadas em estruturas papilares cujo núcleo tem anomalias nucleares evidentes não são suficientes para estabelecer um diagnóstico de carcinoma papilífero (PTC), se enquadraram na categoria de diagnóstico TIR4. O exame histológico dos nódulos com citologia “suspeita” revelou, na maioria dos casos, a presença de um carcinoma papilífero com MR (Risco de Malignidade) de 66% e necessidade da “totalização” do procedimento cirúrgico (ALI; CIBAS, 2010; SAGGIORATO et al, 2005).

4.3 O método da imuno-histoquímica no diagnóstico citológico do bócio

A literatura disponível para estabelecer diagnóstico e prognóstico das tumorações tireoidianas é extensa, incluindo marcadores imuno-histoquímicos,

proliferação, citometria de fluxo, análise cromossômica, citogenética, estudo de ploidia do DNA, análise de atividade oncogene, etc. No entanto, ainda não se conseguiu encontrar um teste que claramente ajude a determinar o comportamento biológico e o prognóstico das tumorações da tireoide (MOYANO et al, 2004).

Novas abordagens tecnológicas mais relevantes, genômica e proteômica estão sendo pesquisadas para criar as autenticações moleculares capazes de separar tumores benignos de malignos da tiróide e, no último grupo, para distinguir tumores com comportamento pouco e muito agressivos (BARDEN et al, 2003; GIORDANO et al, 2005).

Vários marcadores imuno-histoquímicos tem sido estudados na literatura e foi agora descartada a idéia de um marcador único capaz de identificar a malignidade de uma lesão suspeita, colocando cada vez mais a atenção de que a identificação de um “painel” de anticorpos capazes de tornar a informação completa (SAGGIORATO et al, 2005).

O conjunto de mais marcadores fenotípicos que nos permite melhorar a precisão do diagnóstico e valores preditivos de malignidade em lesões citológicas duvidosos, mas também pode fornecer informações importantes sobre prognóstico e terapêutica. Citado por Sherr (2000), particular interesse na literatura científica atual é dirigido aos genes e moléculas, envolvidas no controle do ciclo celular, considerados como principais envolvidos no processo da carcinogênese.

4.4 O ciclo celular e a carcinogênese

A regulação do ciclo celular é um mecanismo excepcionalmente complexo que requer a compreensão de numerosos atalhos moleculares finamente regulados (SHERR, 2000).

O organismo humano consiste num grande número de células cujos núcleos contêm todo o nosso material genético (DNA), localizado em 46 cromossomos (em 23 pares), sendo que a divisão celular é fundamental para a manutenção do estado

de equilíbrio do indivíduo. O processo de divisão celular é constituído basicamente por dois períodos que se repetem continuamente: a interfase e a mitose.

Este processo inclui a replicação cromossomal e a segregação em duas células filhas (KOSHLAND JR, 1989; LINDEN et al, 1992).

Conforme citado por Sherr (2000), está dividido em quatro fases sucessivas: a fase G1 em que a célula fornece para a síntese de todos os componentes a serem distribuídos para as células filhas e complexos de enzimas necessárias para a progressão, a fase S ocorre em que a duplicação do material genético do núcleo, a fase G2 onde continua o crescimento da célula e a síntese de novas moléculas necessárias na fase mitótica.

A replicação do DNA ocorre durante a fase S (síntese de DNA) e a segregação cromossomal durante a fase M (mitótica). Nas células somáticas as fases S e M são separadas pelas chamadas fases “gap” ou intervalo: G1 (pré-sintética) e G2 (pré-mitótica). Na primeira (G1), que ocorre antes da replicação do DNA, há uma série de eventos biológicos responsáveis pelo crescimento celular. Quando atinge um determinado tamanho a célula entra na fase seguinte (S), na qual acontece a síntese do DNA. A célula duplica o seu material genético (replicação do DNA), dando origem a uma cópia de cada cromossomo. Finalmente na fase seguinte (G2), que corresponde ao intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose, a célula verifica se a duplicação do DNA está completa e se prepara para a divisão celular. A fase M é o período mais curto do ciclo celular. Aqui ocorre a condensação dos cromossomos e o seu alinhamento no fuso mitótico, culminando com a separação das cromátides irmãs (NURSE, 1990, 1994, 2000).

Sherr (2000) afirma ainda, que exceto o compartimento germinal, além dos processos fisiopatológicos, a grande maioria das células do organismo humano, permanece na maior parte do tempo, em um estado de não proliferação chamado de fase G0.

O autor antes referido continua discorrendo, que a entrada e a progressão, ao longo do ciclo celular são regulados pelas flutuações no nível de concentração e na atividade de uma molécula específica chamada de *Ciclina*. A síntese e a degradação

da Ciclina especificada segue uma precisa sequência temporal. O ajustamento das diversas fases do ciclo celular depende da Ciclina específica e é regulada a nível da transcrição gênica mas, acima de tudo, nos mecanismos pós-transcricionais de degradação proteossomica ubiquitina-dependente.

4.5 As ciclinas

Ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3) são essenciais para a transição G1-S e a sua síntese, como resultado de estímulos mitogênicos, são imprescindíveis para o gatilho da proliferação celular e a saída da fase quiescente G0 (KHOO, 2002).

A atual referência do painel imuno-histoquímico na literatura para a caracterização das lesões da tiróide consiste em Gal3, HMBE-1 e CK19, que são, no entanto, pouco aplicáveis a lesões oncocitárias para células de Hürthle principalmente pela dificuldade da interpretação do sinal citoplasmático, já que se tratam de células ossifilas que consistem de um grande citoplasma rico em biotina endógena, muitas vezes resultando em sinal não específico (SAGGIORATO et al, 2005).

A ciclina D1 é um regulador da progressão do ciclo celular de G1 a S, codificado por um gene no cromossoma 11q13 que se superexpressa em muitos tumores, mesmo sem alteração do gene em alguns casos. Sugere-se que a ciclina D1 desempenha algum papel na gênese tumoral da tiróide (MOYANO et al, 2004).

O gene CCND1 localizado no cromossoma 11q23 codifica uma proteína nuclear que forma complexos com quinases dependentes de ciclina 4 e 6, resultando na fosforilação e inativação da proteína, permitindo a progressão do ciclo celular de G1 para a fase S.

Células foliculares da tireoide normais não mostram imunorreatividade para ciclina D1. Esta proteína é alvo de beta-catenina e a sua superexpressão está associada com alterações da beta-catenina na progressão do câncer da tiróide (MORIN et al, 1997; LANTSOV et al, 2005).

A ciclina D1 é amplamente estudada na literatura, em lesões da tiróide e seu aumento é agora amplamente reconhecido como indicador de maior agressividade e maior capacidade metastática de tumores malignos da tireoide.

Khoo (2002) infere que, a ciclina D3 parece estar principalmente envolvida na transformação neoplásica das células da tiróide e, sendo um importante *checkpoint* de controle da fase G1 das células foliculares da tireoide pode desempenhar um papel oncogénico a nível nuclear.

A expressão nuclear aumentada de ciclina D1, mRNA e proteína, já foi demonstrada em tumores benignos e malignos da tireoide (KHOO, 2002; NAKASHIMA et al, 2004).

Não existem estudos anteriores no campo citológico, mas no momento em que a neoplasia de células de Hürthle nas categorias diagnósticas TIR3 e TIR4 têm um maior índice de malignidade, torna-se fundamental distinguir entre lesões benignas e malignas para otimizar o tratamento cirúrgico do paciente.

Outro marcador, a ciclina D3 está definitivamente associado a um fenótipo maligno das lesões em células da tireoide e pós-transcricional que levam a sua acumulação e a sua superexpressão estão significativamente associadas a um pior prognóstico. A ciclina D3 aumenta a proliferação de células neoplásicas por sequestrar a proteína p27(KIP1) (ciclina dependente de inibidores de quinase) em um complexo de enzima inativa (DEPOORTERE et al, 1998).

A investigação imunocitoquímica para ciclina D1 e D3, em função dos dados obtidos sugerem que esses marcadores podem ser inseridos como novos membros do painel Gal3, HMBE1 e CK19 para melhor caracterizar as lesões nas células ossifilas no pré-operatório por PAAF (ERICKSON et al, 2000; LUKAS; BARTEK, 2004).

Tumores malignos exibem maior imunorreatividade para ciclina D1, particularmente os carcinomas papilíferos, embora os adenomas foliculares tenham sido descritos por relatar aumento da expressão para ciclina D1 (SAIZ et al, 2002;

NAKASHIMA et al, 2004).

Sem dúvida, os métodos imuno-histoquímicos melhoram a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e a precisão diagnóstica nos estudos tireoidianos, demonstrando aumentando a acurácia inclusive no pré-operatório na avaliação de lesões nodulares de tireoide (BARTOLAZZI et al, 2001; COMSTOCK et al, 2011).

4.6 O bócio na Amazônia

As populações da região Amazônica sofrem com a prevalência aumentada de bócios, os quais se destacam entre as patologias hiperplásicas tireoidianas, muitas vezes demandando técnica cirúrgica diferenciada. No Amazonas, estas populações viajam dias de barco ou horas de avião pela falta de condições de resolutividade em seus locais de origem (BOTELHO et al, 2012).

A tireoide adulta caracteriza-se pela baixa renovação de suas células foliculares; entretanto, mantém o potencial para proliferar em resposta a estímulos. A incidência do nódulo tireoidiano palpável, na população geral, é de cerca de 4 a 7%, contudo, com o advento da ultrassonografia, a prevalência sobe para 30%, mostrando alta capacidade mitogênica do tecido (BARTOLAZZI et al, 2001).

Na população em geral, 3 a 7% em nódulos tireoidiano palpáveis (BAILEY; PILLSBURRY; DRISCOLL, 1998) e, se considerarmos um estudo ultrassonográfico à partir da 5ª década, a incidência de nódulos tireoidianos pode variar de 30% a 50% da população (MENEZES, 2001).

A Amazônia, segundo o 3º Inquérito Nacional relativo à presença de bócio em escolares brasileiros realizado em 1995, apresenta um percentual significativo de pacientes com aumento do volume da glândula tireoide (CABRAL, 1979; MEDEIROS NETO, 1982).

Dentre os fatores ligados a este fato estão: o baixo índice de iodeto de

potássio presente no sal de cozinha, ligados à falta de fiscalização do mesmo; ao baixo índice deste mesmo oligoelemento presente na principal fonte protéica da região, que é o pescado; e à provável associação com a ingestão de tiocianato presente na farinha de macaxeira, largamente consumida na região (BOTELHO, 2000).

5 PROPOSIÇÃO

A maioria das lesões neoplásicas oriundas da glândula tireoide é diagnosticada com base em características histológicas bem definidas. No entanto, há um subconjunto de tumores com arquitetura folicular que não possuem as características de malignidade inequívocas, colocando assim dificuldades na distinção de condições malignas e benignas.

Alguns tumores da tireoide não são derivados do epitélio folicular da tireoide. Em tais casos, a utilização de técnicas complementares, incluindo análise imuno-histoquímica e molecular pode melhorar significativamente o diagnóstico.

A caracterização molecular dos tumores é uma abordagem tecnológica promissora que pode revelar novos biomarcadores importantes a serem incorporados no tratamento de lesões da tireoide.

A proposta deste trabalho é avaliar a expressão imuno-histoquímica da ciclina D1 em bócios de tireoidectomias realizadas em Manaus/AM.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Descrição da área de estudo

Estudo transversal realizado com material proveniente de exames histopatológicos produtos de tireoidectomias realizadas por bócio na cidade de Manaus-AM, e analisados imuno-histoquímicamente, utilizando-se o método do polímero marcado com peroxidase em cortes submetidos aos anticorpos primários ciclina D1.

6.2 Amostra

Composta por blocos de parafina de bócios oriundos de 41 pacientes tireoidectomizados, operados na cidade de Manaus-AM.

6.3 Critérios de inclusão

- Paciente oriundo da região amazônica ocidental;
- Paciente eutireoideo;
- Não haver suspeita ou confirmação de doença maligna tireoidea;
- Não ter sido exposto a tratamento radioativo prévio.

6.4 Critérios de exclusão

Pacientes submetidos a tireoidectomia com diagnóstico histopatológico de doença de Basedow-Graves, qualquer tireoidite, neoplasias de células de Hürthle

(adenomas e carcinomas), neoplasias foliculares, carcinomas papilífero, folicular, medular, anaplásico, indiferenciado, linfoma primitivo da tireoide, sarcoma tireoideo e tumores metastáticos.

6.5 Aspectos éticos

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, respeitando a Resolução 196/96, da CONEP.

Os pacientes foram identificados, orientados sobre os objetivos do estudo e, após terem compreendido e concordado espontaneamente em participar da pesquisa por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), responderam ao questionário com dados pessoais e dados dos exames complementares previamente realizados.

6.6 Análise histopatológica e imuno-histoquímica

Os dados foram colhidos por meio de um questionário semi-estruturado com questões abertas e fechadas aplicados aos pacientes selecionados (Anexo 1).

Após o tratamento cirúrgico e estudo histopatológico, compuseram a amostra as peças obtidas dos tecidos tireoideanos parafinizados, com diagnóstico de bócio pela técnica de coloração com hematoxilina e eosina, e foram sujeitas a coloração pela técnica de imuno-histoquímica.

6.10 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi feita mediante uma avaliação qualitativa da proteína ciclina D1 nas tumorações estudadas (bócios). Foram consideradas positivas as células com marcação imuno-histoquímica de coloração acastanhada,

com marcações citoplasmáticas e nucleares independente da quantidade de células marcadas e não sendo levada em consideração a intensidade da coloração.

Foi atribuído o escore “0” (zero) aos casos negativos para a ciclina D1 e escore “1” (um) aos casos positivos para essa proteína.

As células positivas para a para a ciclina D1 foram contadas manualmente - 1000 células por campo - escolhidas aleatoriamente em cada caso estudado, obtidas em microscópio de luz com aumento final de 400x e câmera fotográfica específica acoplada a um sistema computadorizado.

6.11 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos neste estudo foram analisados pelo programa ANOVA para observação de possíveis interações da expressão da ciclina D1 e os bócios, adotando para as associações a significância estatística (p) e *odds ratio* (OR).

Foram realizados testes Mann-Whitney para comparar a marcação imunohistoquímica nuclear e citoplasmática da ciclina D1 entre as tumorações estudadas.

7 RESULTADOS

A amostra foi composta por quarenta e um pacientes, de ambos os gêneros com as características clínicas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características epidemiológicas e clínicas dos 41 pacientes.

No.	GÊNERO	IDADE	PROCEDÊNCIA	DIAGNÓSTICO	RESULTADOS (CICLINA D1)
1	F	30	Manaus	Bócio Nodular Atóxico	Positivo
2	F	49	Manaus	Bócio Nodular Atóxico	Positivo
3	F	50	Interior*	Bócio Nodular Atóxico+ Adenoma folicular	Positivo
4	F	40	Outros Estados	Bócio Nodular Atóxico	Positivo
5	F	50	Manaus	Bócio Multinodular	Positivo
6	F	69	Interior*	Bócio Colóide	Positivo
7	F	45	Manaus	Bócio Adenomatoso + Adenoma folicular	Positivo
8	F	14	Interior*	Adenoma folicular	Positivo
9	F	74	Outros Estados	Bócio Multinodular Atóxico	Positivo
10	F	53	Interior*	Bócio Multinodular Atóxico	Positivo
11	F	47	Manaus	Adenoma folicular	Positivo
12	F	27	Interior*	Bócio Nodular Atóxico	Positivo
13	F	31	Outros Estados	Hiperplasia Nodular	Positivo
14	F	32	Outros Estados	Bócio Nodular Atóxico	Positivo
15	F	59	Manaus	Bócio Multinodular Atóxico	Positivo
16	F	48	Manaus	Bócio Nodular Atóxico	Positivo
17	F	52	Manaus	Bócio Multinodular Atóxico	Positivo
18	F	45	Manaus	Bócio Adenomatoso	Negativo

19	F	62	Manaus	Bócio Nodular Atóxico	Negativo
20	F	29	Outros Estados	Hiperplasia Multinodular Cistificada	Negativo
21	F	54	Interior*	Bócio Nodular Atóxico	Negativo
22	F	60	Manaus	Bócio Multinodular Atóxico	Negativo
23	F	47	Outros Estados	Hiperplasia Nodular + Nódulo Adenomatoso	Negativo
24	F	45	Interior*	Bócio Adenomatoso	Negativo
25	F	58	Interior*	Bócio Colóide	Negativo
26	M	59	Interior*	Bócio Adenomatosos	Negativo
27	M	53	Interior*	Bócio Colóide Difuso	Negativo
28	F	49	Manaus	Bócio Multinodular Atóxico	Negativo
29	F	44	Interior*	Bócio Colóide	Negativo
30	F	55	Interior*	Bócio Adenomatoso	Negativo
31	F	32	Interior*	Bócio Multinodular Atóxico	Negativo
32	M	54	Manaus	Bócio Nodular Atóxico	Negativo
33	F	51	Interior*	Adenoma folicular	Negativo
34	F	30	Interior*	Hiperplasia Multinodular	Negativo
35	M	45	Manaus	Bócio Nodular Atóxico	Negativo
36	F	49	Interior*	Bócio Adenomatoso com degeneração cística	Negativo
37	F	31	Interior*	Bócio Colóide Multinodular	Positivo
38	F	68	Manaus	Bócio Adenomatoso	Negativo
39	F	53	Interior*	Nódulo Colóide Hipercelular	Positivo
40	M	68	Interior*	Bócio colóide	Positivo
41	F	47	Manaus	Bócio Multinodular Atóxico	Negativo

F – Feminino / M – Masculino

* Interior do Estado do Amazonas

Desses pacientes, cinco (12,2%) são de gênero masculino, enquanto 36 (87,8%) são de femininos, o que corresponde à maioria dos pacientes avaliados e com diagnóstico para bócio (Gráfico 1).

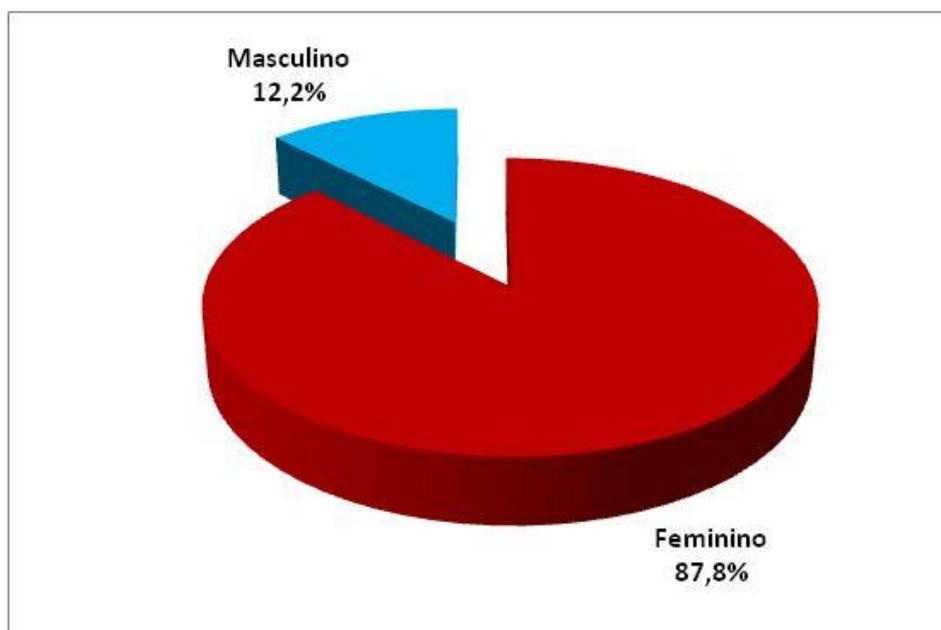


Gráfico 1 - Distribuição por gênero dos pacientes avaliados.

Com relação à idade, conforme apresentado no Gráfico 2, a maioria dos pacientes está na faixa etária de 47 a 57 anos. A idade mínima entre os pacientes foi de 14 anos e idade máxima foi de 74 anos, com média de 48 anos.

Dos 36 pacientes de femininos, 15 (41,7%) estão na faixa etária de 47 a 57 anos de idade, enquanto que dos cinco pacientes de masculinos, quatro (80,0%) têm entre 47 e 68 anos de idade (Tabela 2).

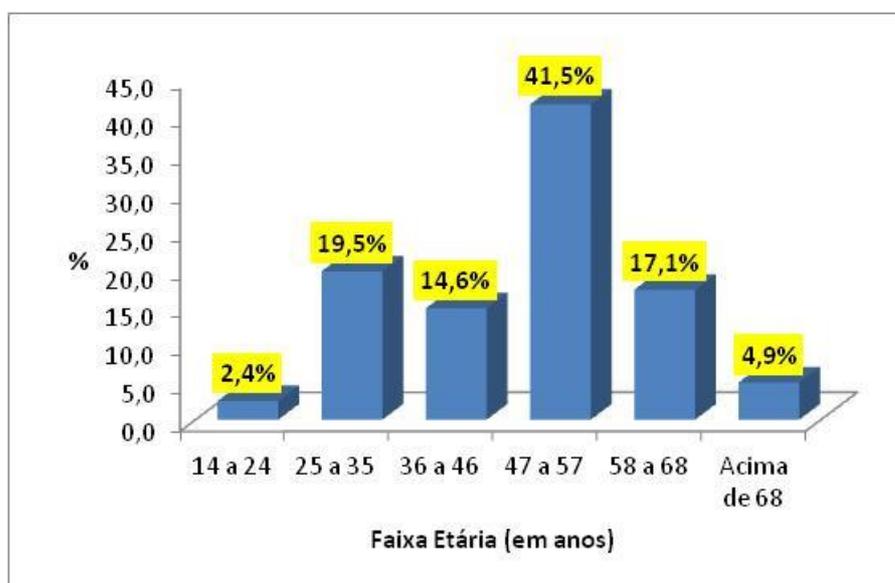


Gráfico 2 - Distribuição por faixa etária dos pacientes avaliados.

Tabela 2. Correlação entre o gênero e a faixa etária dos pacientes.

FAIXA ETÁRIA (em anos)	GÊNERO				TOTAL
	Feminino	%	Masculino	%	
14 a 24	1	2,8	0	0,0	1
25 a 35	8	22,2	0	0,0	8
36 a 46	5	13,9	1	20,0	6
47 a 57	15	41,7	2	40,0	17
58 a 68	5	13,9	2	40,0	7
Acima de 68	2	5,6	0	0,0	2
TOTAL	36	100,0	5	100,0	41

Quanto ao diagnóstico, 11 (26,8%) pacientes apresentaram Bócio Multinodular e um (2,4%) apresentou Nódulo Colóide (Gráfico 3).

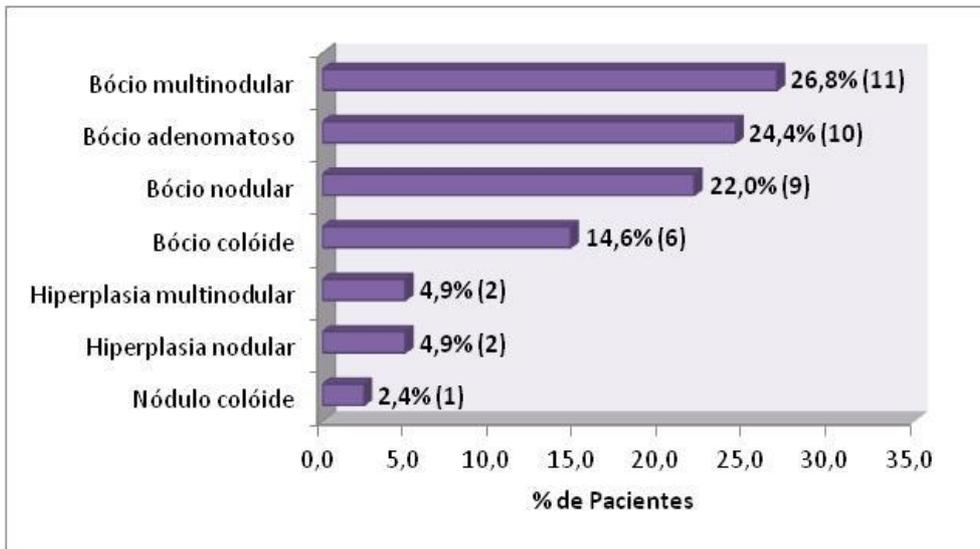


Gráfico 3 - Distribuição por diagnóstico dos pacientes avaliados.

Quanto ao resultado da ciclina D1 dos pacientes, verificou-se que 20 (48,8%) foram positivos, enquanto 21 (51,2%) foram negativos para o referido marcador (Gráfico 4) (Figuras 1, 2, 3).

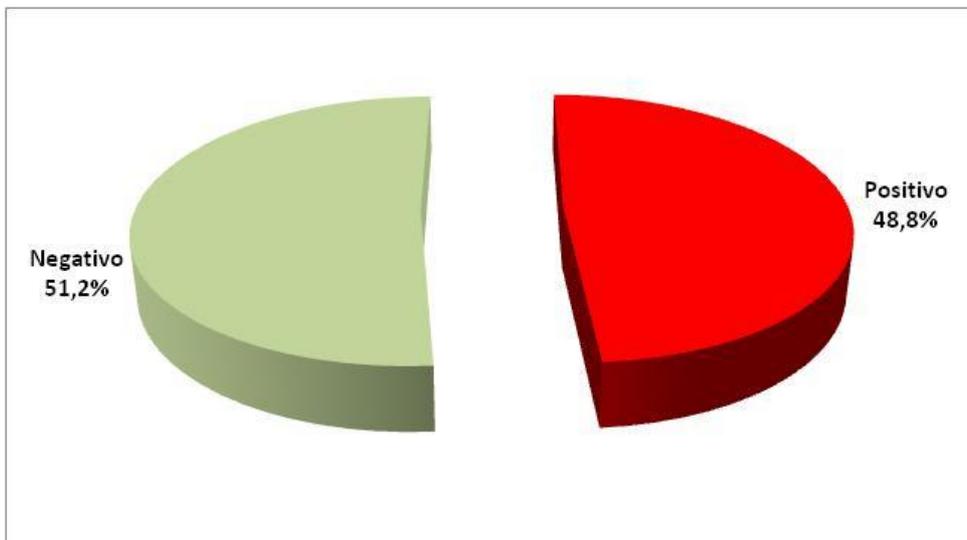


Gráfico 4 - Resultado da CD1 dos pacientes avaliados.

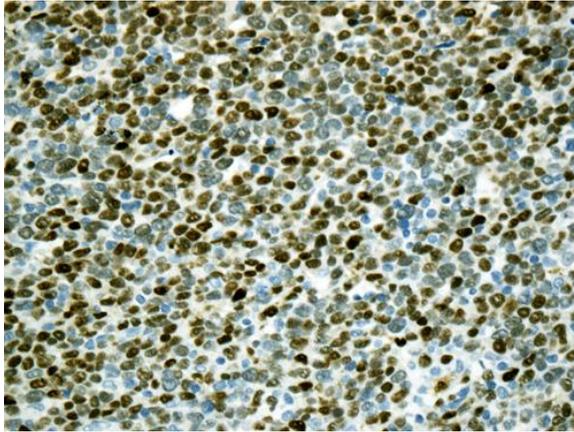


Figura 1 - Células coradas por CD1 nas lâminas positivas (castanho).

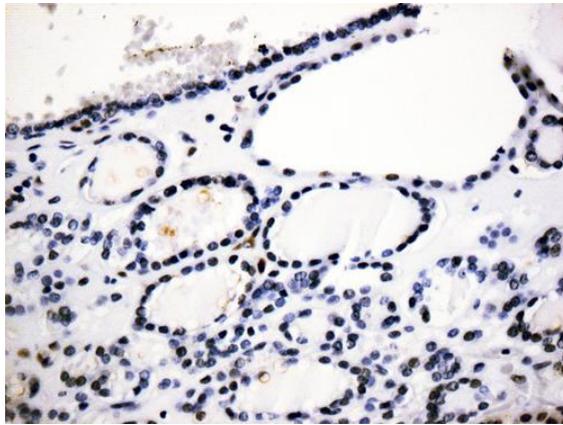


Figura 2 - Células coradas por CD1 na segunda lâmina positiva (castanho).

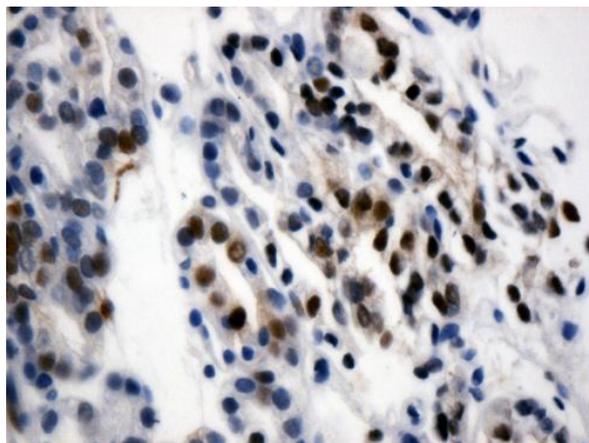


Figura 3 - Células coradas com CD1 apresentando positividade (castanho).

A tabela 3 sumariza os diagnósticos por gênero, e demonstra a fraca correlação entre essas variáveis ao teste de Pearson = 1,7%.

Tabela 3 - Correlação entre diagnóstico e gênero dos pacientes avaliados.

ANATOMOPATOLÓGICO	GÊNERO				TOTAL
	Feminino	%	Masculino	%	
Nódulo colóide	1	2,8	0	0,0	1
Hiperplasia nodular	2	5,6	0	0,0	2
Hiperplasia multinodular	2	5,6	0	0,0	2
Bócio colóide	4	11,1	2	40,0	6
Bócio nodular	7	19,4	2	40,0	9
Bócio adenomatoso	9	25,0	1	20,0	10
Bócio multinodular	11	30,6	0	0,0	11
TOTAL	36	100,0	5	100,0	41

Dos 20 pacientes com resultados positivos para ciclina D1, sete (35,0%) pacientes eram portadores de Bócio Multinodular e cinco (25,0%) de Bócio Nodular, sendo esses os diagnósticos mais frequentes entre os pacientes positivos (Tabela 4).

A correlação observada entre o diagnóstico e os resultados para ciclina D1 foi pequena e positiva (Correlação de Pearson = 26,1%), e indicou que nesses tipos de bócio os resultados são positivos para ciclina D1.

Tabela 4 - Correlação entre o exame anátomopatológico e a IHQ.

ANATOMOPATOLÓGICO	RESULTADO (Ciclina D1)				TOTAL
	Positivo	%	Negativo	%	
Nódulo colóide	1	5,0	0	0,0	1
Hiperplasia nodular	1	5,0	1	4,8	2
Hiperplasia multinodular	0	0,0	2	9,5	2
Bócio colóide	3	15,0	3	14,3	6
Bócio nodular	5	25,0	4	19,0	9
Bócio adenomatoso	3	15,0	7	33,3	10
Bócio multinodular	7	35,0	4	19,0	11
TOTAL	20	100,0	21	100,0	41

Os resultados positivos da ciclina D1 foram mais frequentes entre os pacientes de gênero feminino (Tabela 5).

A relação estatística entre o gênero e o resultado da ciclina D1, não foi significativa, considerando um nível de 5% de significância, por meio do teste Exato de Fisher (p -valor = 0,16), embora a chance de um paciente de gênero feminino ter resultado positivo para ciclina D1 é 4,5 vezes maior do que em pacientes de gênero masculino (OR = 4,5).

Tabela 5 - Relação entre o gênero e os resultados da ciclina D1.

GÊNERO	RESULTADO (Ciclina D1)				TOTAL
	Positivo	%	Negativo	%	
Feminino	19	95,0	17	81,0	36
Masculino	1	5,0	4	19,0	5
TOTAL	20	100,0	21	100,0	41

p -valor = 0,16

Com relação à associação entre o resultado da IHQ e a faixa etária, esses dados são categorizados na Tabela 6, em que se observou que a maioria dos pacientes positivos está na faixa etária de 47 a 57 (40,0%). com correlação negativa entre as referidas variáveis (Correlação de Pearson= 31,2%).

Tabela 6 - Correlação entre a faixa etária e a análise IHQ dos pacientes.

FAIXA ETÁRIA (em anos)	RESULTADO (Ciclina D1)				TOTAL
	Positivo	%	Negativo	%	
14 a 24	1	5,0	0	0,0	1
25 a 35	5	25,0	3	14,3	8
36 a 46	2	10,0	4	19,0	6
47 a 57	8	40,0	9	42,9	17
58 a 68	2	10,0	5	23,8	7
Acima de 68	2	10,0	0	0,0	2
TOTAL	20	100,0	21	100,0	41

Observou-se ainda que a positividade nos pacientes avaliados aumentou até a faixa de 47 a 57 anos e foi diminuindo o número de casos positivos a partir dessa mesma faixa etária (Gráfico 5).

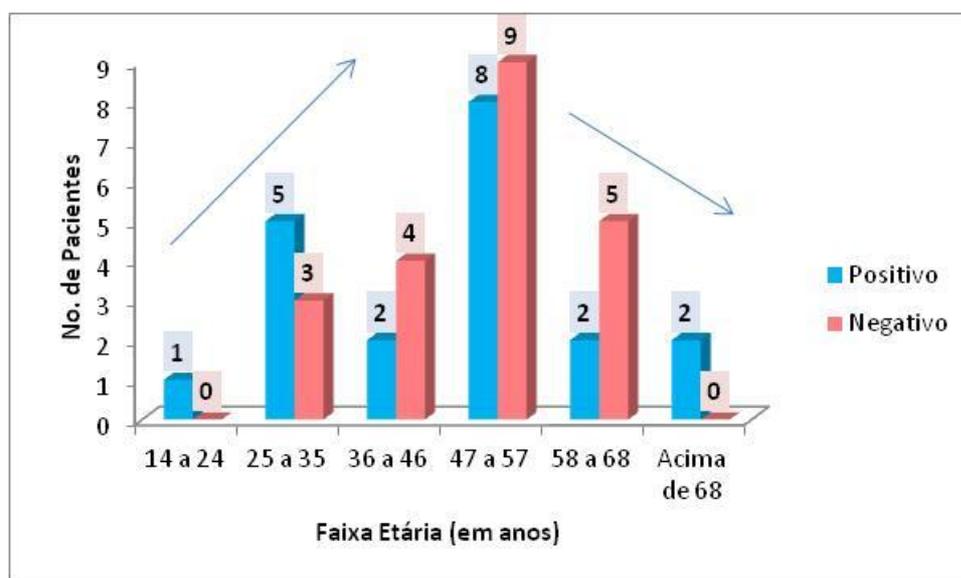


Gráfico 5 - Distribuição gráfica da correlação entre a faixa etária e os resultados para CD1.

8 DISCUSSÃO

A proteína CD1 tem sido freqüentemente superexpressa em vários tipos de tumorações da região de cabeça e pescoço e, por isto, citada em diversos trabalhos, principalmente quando se trata do estudo de patologias malignas. Lantsov et al (2005) avaliaram através de imuno-histoquímica a expressão da ciclina D1 no microcarcinomas papilífero e observaram uma superexpressão dessa proteína (mais de 5% de núcleos de células marcadas). Os autores sugerem que a superexpressão da ciclina D1 pode contribuir para o crescimento tumoral dos microcarcinomas. A superexpressão da CD1 foi também estudada por Nakashima (2004) , Saiz (2002) e Khoo (2002), sempre com trabalhos associados ao aumento da proliferação das células neoplásicas nos carcinomas.

No presente trabalho observou-se a expressão de CD1 nos bócios (20/41 casos positivos, correspondendo a 48,8% dos casos). O interesse inicial era avaliar a expressão da CD1 como valor preditivo que pudesse contribuir com a escolha da radicalidade do ato cirúrgico no pré-operatório através da PAAF que, com pouco material celular, pudesse adiantar o diagnóstico morfológico e imuno-histoquímico fornecendo um segundo parâmetro (diagnóstico molecular), barato e eficiente, para respaldar a conduta cirúrgica.

Conhecendo-se o papel da CD1 na progressão do ciclo celular, pode-se sugerir que esta proteína está associada à maior proliferação celular e agressividade que essas tumorações apresentam, e, no surgimento e desenvolvimento dos bócios, uma vez que também se tratam de proliferações anormais do tecido inicialmente sadio.

Os resultados da literatura são interessantes, porém conflitantes e o somatório dos diversos estudos sobre a CD1 relatados na literatura poderão elucidar o papel dessa proteína na carcinogênese e com isso contribuir para o estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e tratamento de algumas neoplasias benignas ou malignas.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas neoplasias benignas da glândula tireoide, os bóciós nodulares, hiperplasias glandulares e adenoma folicular, a expressão da CD1 não parece estar relacionada com a diferenciação celular como nas lesões com algum grau de malignidade onde pode exercer uma função de multiplicação celular, levando as células à proliferação pela ativação da CD1.

Os resultados deste trabalho, inédito em uma região bociogênica, e com bóciós benignos, apontam a CD1 como possível contribuição na elucidação citológica, pré-operatória, de lesões inconclusivas ou suspeitas na PAAF, mas, reforça a necessidade de se estabelecerem novos marcadores celulares para a doença, de maneira a compor um perfil diagnóstico espectral imuno-histoquímico dos bóciós.

11 REFERÊNCIAS

ALI, Syed Z.; CIBAS, Edmund S. **The bethesda system for reporting thyroid cytopathology**. Springer US, 2010.

BAILEY, B. J.; PILLSBURRY, H. C.; DRISCOLL, B. P. **Head and neck surgery. Otolaryngology**, Philadelphia (EUA), v. 2, 1998.

BARDEN, C.B. et al. Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. **Clin. Cancer Res.**, v.9, p. 1792–1800, 2003.

BARTOLAZZI, A. et al. Thyroid cancer study group. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. **Lancet**, v. 26, p. 1644-50, 2001.

BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert Opin Biol Ther**, v.2, n.4, p.371-93, 2002.

BOTELHO, J. B. L. Considerations sur la pathologie de la glande thyroïde. Étude analytique de 3771 malades. **La thyroïdectomie typique - ses différentes formes - comme la meilleure orientation thérapeutique**. Paris, 1981. Tese (Doutorado)-- Universidade de Paris VI – L'Université Pierre e Marie Curie.

_____. **História da Medicina: da abstração à materialidade**. Manaus: Valer, 2004.

_____. **Otorrinolaringologia e cirurgia de cabeça e pescoço**. Manaus: EDUA, 2000.

_____. et al. Estudo das relações anatomocirúrgicas entre os nervos laríngicos recorrentes e o ligamento de Berry. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 5, 2012 .

BURGESS JR, TUCKER P. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. **Thyroid**, v.16, p.47-53, 2006.

CABRAL, J. M. **Bócio endêmico: contribuição ao estudo do bócio no Amazonas.** Manaus, 1979. Monografia (pós-graduação em Endocrinologia e Metabologia)-- Universidade do Amazonas.

_____. **Doenças da tireoide: como diagnosticar e tratar.** Manaus: EDUA, 2009.

COMSTOCK C.E.S. et al. Cyclin D1 is a selective modifier of androgen-dependent signaling and androgen receptor function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8117-27, 2011.

DEPOORTERE, F. et al. A requirement for cyclin D3-cyclin-dependent kinase (cdk)-4 assembly in the cyclic adenosine monophosphate-dependent proliferation of thymocytes. **J. Cell Biol.** v. 140, p. 1427-1439, 1998.

ERICKSON, L.A. et al. Pathologic features, proliferative activity, and cyclin D1 expression in Hurthle cell neoplasms of the thyroid. **Mod Pathol.**, v. 13, p.186-192, 2000.

FISCHER S., ASA, S. L. Application of immunohistochemistry to thyroid neoplasms, **Arch Pathol Lab Med.**, v. 132, p.359–72, 2008.

GIORDANO, T.J. et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. **Oncogene.**, v.24, p. 6646–56, 2005.

HERMUS, A. R.; HUYSMANS, D. A. Treatment of benign nodular thyroid disease. **N. Engl. J. Med**, v. 338, p.1438-47, 1998.

HIS, E.D. A Practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory. **Arch Pathol Lab Med**, v.125, n.2, p.289-94, 2001.

KHOO, M.L. Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 87, p.1810-13, 2002.

KOSHLAND JR. The cell cycle. **Science**, v. 246, n.4930, p.545, 1989.

KOWALSKI, L. P. **Afecções cirúrgicas do pescoço**. São Paulo: Atheneu, 2005.

LANTSOV, D. et al. Cyclin D1 overexpression in thyroid papillary microcarcinoma: its association with tumour size and aberrant beta-catenin expression. **Histopathology**. V. 47, p. 248–56, 2005.

LINDEN, M.D. et al. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **Am J Clin Pathol.**, v.97, p.S4-13, 1992.

LUKAS, J.; BARTEK, J. Cell division: the heart of the cycle. **Nature**, v.432, p.564-67, 2004.

MEDEIROS NETO, G. M. **Cento e oitenta anos de bócio endêmico no Brasil**. **Arquivos Bras. de Endocrinologia & Metabologia**, v. 26, n. 4, dez. 1982.

MENEZES, Marcelo Benedito. **Diagnóstico e tratamento dos bóciós não tóxicos.** In: **Tratado de cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia.** Atheneu, v.1, cap. 44, p. 551-60, 2001.

MORIN, P.J. et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science**, v.275, p. 1787–90, 1997.

MOYANO, L. et al. HBME and Cyclin D1 as diagnostic markers for follicular thyroid carcinoma. **Rev Méd Chile**, v. 132, p. 279-84, 2004.

NAKASHIMA, M. et al. Cyclin D1 overexpression in thyroid tumours from a radio-contaminated area and its correlation with Pin1 and aberrant beta-catenin expression. **J Pathol.**, v. 202, p. 446–55, 2004.

NURSE P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, p. 71-8, 2000.

_____. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. **Cell**, v.79, p. 547-50.1994.

_____. Universal control mechanism in regulating onset of M-phase. **Nature**, v. 344, p.503-8, 1990.

REZK, S.; KHAN, A. Role of immunohistochemistry in the diagnosis and progression of follicular epithelium-derived thyroid carcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.**, v. 13, p. 256–64, 2005.

RIES, L.A.G. et al. SEER Cancer Statistics Review: 1975-2005. Bethesda, MD: **National Cancer Institute**, 2005.

SAGGIORATO, E. et al. Characterization of thyroid “follicular neoplasms” in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. **Endocr Relat Cancer**, v. 12, p. 305-17, 2005.

SAIZ, A.D. et al. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. **J Pathol.**, v. 198, p. 157–62, 2002..

SALVATORE, G. et al. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.89, p. 5175–80, 2004.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res.**, v. 60, p. 3689- 95, 2000.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. World Cancer Report. Lyon: **IACR Press**, 2003.

WERNER, B. Practical use of immunohistochemistry in surgical pathology. **J Bras Patol Med Lab**, v.41, n.5, p.353-64, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título do Estudo: “A expressão da ciclina d1 nos bócios submetidos a tireoidectomias em Manaus/AM”.

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo intitulado “A EXPRESSÃO DA CICLINA D1 NOS BÓCIOS SUBMETIDOS A TIREOIDECTOMIAS EM MANAUS/AM” porque você tem perfil e preenche os critérios para, na condição de sujeito, participar desta pesquisa. *Sujeito da Pesquisa* é a expressão dada a todo ser humano que, de livre e espontânea vontade e após ser devidamente esclarecido, concorda em participar de pesquisa, doando material biológico, se submetendo a variados procedimentos invasivos ou não, ou ainda fornecendo informações. Neste estudo você será submetido(a) a uma entrevista com o objetivo de fornecer informações para o melhor entendimento do assunto em questão, e você terá toda autonomia para decidir entrar ou não na pesquisa. Também, você terá toda liberdade para se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo de qualquer natureza. Tanto sua pessoa quanto os dados por você fornecidos serão mantidos sob absoluta confidencialidade e, portanto, ninguém mais terá conhecimento sobre sua participação. Embora a natureza desta pesquisa apresente risco muito baixo, você tem a garantia de indenização por parte da instituição promotora da pesquisa, do investigador e do patrocinador (quando houver) se acontecer dano(s) à sua saúde, em decorrência da pesquisa; e sua decisão de participar do estudo não está de maneira alguma associada a qualquer tipo de recompensa financeira ou em outra espécie. Entretanto, você pode ser ressarcido de eventuais despesas, tais como transporte e alimentação, quando for o caso.

Sempre que for necessário esclarecer alguma dúvida sobre o estudo, você deverá buscar contato com o coordenador da pesquisa Rodolfo Fagionato de Freitas no endereço Avenida Apurinã, nº 4, Praça 14 de Janeiro. Fone 3305-4747.

Para quaisquer informações, fica disponibilizado o endereço do Serviço de

Cirurgia do Hospital Universitário Getúlio Vargas, Avenida Apurinã, nº 4, Praça 14 de Janeiro CEP: 69020-170 - Manaus / AM - Fone (92) 3305-4747.

C O N S E N T I M E N T O

Li, tomei conhecimento, entendi os aspectos da pesquisa e, voluntariamente, concordo em participar do estudo.

Assinatura ou Impressão Datiloscópica do Sujeito da Pesquisa

Residência:

Fone(s):

Assinatura do pesquisador

Data: _____ / _____ / _____

ANEXO 2 - FORMULÁRIO PADRÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

IDENTIFICAÇÃO

Nome:

Idade:

Telefone e endereço:.....

DIAGNÓSTICO PRÉ-OPERATÓRIO:

Início dos Sintomas: - de 1 ano 1 a 3 anos 4 a 8 anos + de 9 anos

Primeiro diagnóstico: - de 1 ano 1 a 3 anos 4 a 8 anos

HISTÓRIA SOCIAL:

Origem: Zona urbana Capital Interior Zona rural

Base alimentar por semana:

Carne vermelha: 0 - 2X 3 - 5X todos os dias

Peixe: 0 - 2X 3 - 5X todos os dias

Farinha de mandioca: 0- 2X 3 - 5X todos os dias

Legumes: 0 - 2X 3 - 5X todos os dias.

HISTÓRIA FAMILIAR:

Casos de bócio na família.

Antecedentes familiares de bócio: 1º grau 2º grau 3º grau

Carcinoma de tireoide na família: 1º grau 2º grau 3º grau

Sem antecedentes conhecidos

EXAMES SOLICITADOS (específicos): data

TSH: elevado normal baixo

T3: elevado normal baixo

T4: elevado normal baixo

T4 L: elevado normal baixo

CINTILOGRAFIA:

Nódulo hipocaptante Nódulos hipercaptante

Outros:.....

.....

Captação:

Peso estimado:

ULTRASSONOGRRAFIA

Bócio uninodular Lobo esquerdo Lobo direito

Bócio multinodular Lobo esquerdo Lobo direito

Diâmetro total: 0 a 2 cm 2 a 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

Exame imunohistoquímico:

Expressão de Ciclina D1

Porcentual

Ausente;

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

2+ moderadamente positiva ou de 11 a 25% do material examinado;

3+ positiva – entre 26 a 50% de positividade do material examinado;

4+ fortemente positiva – acima de 50% do material examinado.

Intensidade

Ausente;

1+ fracamente positiva;

2+ moderadamente positiva;

3+ positiva.

4+ fortemente positiva.

ESQUEMA DO BÓCIO (opcional):

normal 0 a 10 mm acima de 10 mm



Assinatura do pesquisador

Data: _____/_____/_____