LIGIA V. MONTALI DA ASSUMPÇÃO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREÓIDE: AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA (PCNA, p53 e bcl-2) E SUAS CORRELAÇÕES COM O PROGNÓSTICO

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área Medicina Interna.
Campinas, 20 de fevereiro de 2001.

Profa. Dra. Míriam Ap. da Silva Trevisan
Orientadora

CAMPINAS
2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

LIGIA V. MONTALI DA ASSUMPÇÃO

CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREÓIDE: AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA (PCNA, p53 e bcl-2) E SUAS CORRELAÇÕES COM O PROGNÓSTICO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Medicina, área de Medicina Interna

ORIENTADORA:
PROFª DRA MIRIAM A. DA SILVA TREVISAN

CO-ORIENTADOR:
PROF. DR. JOSÉ VASSALLO

CAMPINAS
2001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

As79c

Assumpção, Ligia Vera Montali da

Carcinoma diferenciado da tireóide: avaliação clínica, histopatológica e imunohistoquímica (PCNA,p53 e bc1-2) e suas correlações com o prognóstico / Ligia Vera Montali da Assumpção. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Miriam Aparecida da Silva Trevisan, José Vassallo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cancer. 2. Tireóide - doenças. I. Miriam Aparecida da Silva Trevisan. II. José Vassalo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora Da Tese De Doutorado

Orientadora: Profª. Dra Miriam A. Da Silva Trevisan

Membros:

1. **Profª. Dra Miriam A. Da Silva Trevisan**
2. **Prof. Dr. Walter Bloise**
3. **Profª. Drª.** Fatima R. Chaves -
4. **Profª. Dra Laura Sterian Ward**
5. **Profª. Dra Maria Tereza Matias Baptista**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/02/2001

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela vida,
por sua luta, por seu exemplo

Ao meu esposo e filhos,
pela compreensão e colaboração

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Miriam Ap. S. Trevisan orientadora e amiga, pela boa vontade e disponibilidade de tempo na seleção dos blocos para este estudo, de forma especial pela paciência e pelo respeito a mim dedicados durante todo este tempo.

Ao amigo Prof. Dr. José Vassallo, co-orientador deste trabalho, pelas valiosas sugestões e paciência em conferir comigo todas as lâminas de imuno-histoquímica

Aos pacientes, pela participação e estímulo aos nossos estudos

Aos médicos residentes da endocrinologia, pela atualização e manutenção dos dados dos protocolos

Às equipes de Cirurgia Torácica e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pelo tratamento dos pacientes que compartilhamos.

À Dra. Marília Martins S. Marone, do Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, que durante muitos anos foi responsável pela realização dos exames complementares e pela administração das doses terapêuticas aos nossos pacientes.

À equipe do Serviço de Medicina Nuclear do HC-UNICAMP, pela presteza na realização dos exames complementares específicos.

À equipe da DIMEN - Campinas, pela administração das doses terapêuticas aos nossos pacientes e pela disposição em discutir e auxiliar nas decisões dos casos mais difíceis.

Ao Luiz A. Fontana do Departamento de Anatomia Patológica pelo auxílio na separação dos blocos no arquivo

À Fernanda Paula Oliveira do LAPE - CAISM, pelo preparo das lâminas .

Aos amigos Glauce A. Pinto, Marisa Almeida Matsura e Paulo de Tarso Rocha do LAPE- CAISM, pelo auxílio nas dificuldades enfrentadas no laboratório.

À Silvia Pierre Irazusta do LAPE- CAISM, pela paciência nos meus primeiros passos dentro do laboratório, pelo inestimável auxílio no preparo e análise das lâminas de imuno-histoquímica

À Andrea Ferreira Semolini, da Comissão de Pesquisa FCM/UNICAMP, pela paciência e pela avaliação estatística detalhada.

Ao Ademir Souza da Silva, pela boa vontade e presteza no socorro dos meus "sufocos" com o computador.

Ao Prof. Dr Luis Alberto Magna, pelas preciosas sugestões

Ao Prof. Dr Eros Antonio de Almeida, pelo apoio e incentivo constantes.

À amiga Profa. Dra Liliam T. Lavras Costallat pelo incentivo e apoio nas horas de desânimo.

À minha grande amiga Profa. Dra. Maria Tereza Matias Baptista, pela convivência, pelo incentivo, pelas "dicas" e auxílio em diversas etapas deste trabalho.

Aos amigos da Disciplina de Endocrinologia, Profs. Drs. Marcos Antonio Tambascia, Maria Tereza Matias Baptista, Elizabeth João Pavin, Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann, e aos médicos Walter José Minicucci, Heraldo Mendes Garmes, Maria Candida Parisi, pela compreensão e colaboração

"São muitos os que se obstinam em seguir pelo caminho escolhido; poucos os que perseguem um objetivo"

RESUMO.....xxi

INTRODUÇÃO.....23

OBJETIVOS.....37

CASUÍSTICA E METODOLOGIA 41

RESULTADOS.....53

DISCUSSÃO.....71

CONCLUSÕES.....81

SUMMARY.....85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89

ANEXOS.....107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição dos 135 pacientes de acordo com sexo e cor **43**

TABELA 2 – Distribuição dos 135 pacientes de acordo com a faixa etária e sexo..... **44**

TABELA 3 – Distribuição de 121 pacientes de acordo com o tamanho do tumor..... **44**

TABELA 4– Distribuição de 108 pacientes de acordo com o grau de diferenciação tumoral **45**

TABELA 5 -Distribuição de 115 pacientes de acordo com as metástases ao diagnóstico..... **45**

TABELA 6 - Distribuição de 132 pacientes de acordo com a evolução..... **46**

TABELA 7 – Freqüência de 108 casos de acordo com grau de diferenciação e tipo histológico do tumor..... **57**

TABELA 8 - Freqüência das metástases ao diagnóstico de acordo com tipo histológico **58**

TABELA 9 - Freqüência da ocorrência de eventos durante o seguimento de acordo com o tipo histológico..... **59**

TABELA 10 - Resultado das reações para PCNA de acordo com o tipo histológico e grau de diferenciação do tumor 60

TABELA 11 - Resultado das reações para proteína p53 de acordo com o tipo histológico e grau de diferenciação do tumor 61

TABELA 12 - Resultado das reações para bcl-2 de acordo com o tipo histológico e grau de diferenciação do tumor 61

TABELA 13 - Resultados das associações segundo o teste Qui-Quadrado ou exato de Fisher 62

TABELA 14 - Resultados das associações segundo o teste Qui-Quadrado ou exato de Fisher entre pacientes e grupo controle. 63

TABELA 15- Resultados das comparações entre as curvas de sobrevida..... 67

TABELA 16 - Resultado da Regressão de Cox para Análise Univariada..... 68

TABELA 17 - Resultado Final da Regressão de Cox - Análise Multivariada..... 69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Distribuição da idade ao diagnóstico nos carcinomas papilíferos e foliculares (histograma)..... **55**

FIGURA 2 - Distribuição do tamanho do nódulo nos carcinomas papilíferos e foliculares (histograma)..... **56**

FIGURA 3 - Curva de sobrevida para 105 pacientes do sexo feminino e 27 pacientes do sexo masculino..... **63**

FIGURA 4 - Curva de sobrevida para 75 pacientes com idade ≤ 45 anos e 57 com idade > 45 anos..... **64**

FIGURA 5 - Curva de sobrevida para 77 pacientes com tamanho do nódulo ≤ 4 cm e 42 com tamanho do nódulo >4 cm. **64**

FIGURA 6 - Curva de sobrevida para 37 pacientes com o tipo histológico folicular e 95 pacientes com o tipo histológico papilífero **65**

FIGURA 7 - Curva de Sobrevida de acordo com o grau de diferenciação: 65 pacientes bem diferenciado, 29 pacientes moderadamente diferenciado e 11 pacientes com pouco diferenciado..... **65**

FIGURA 8 - Curva de sobrevida para 30 pacientes com classificação PCNA negativo e 30 pacientes com classificação PCNA positivo **66**

FIGURA 9 - Curva de sobrevida para 50 pacientes com classificação p53 negativo e 10 pacientes com classificação p53 positivo..... **66**

FIGURA 10 - Curva de sobrevida para 13 pacientes com classificação bcl-2 negativo e 47 pacientes com classificação bcl-2 positivo. **67**

RESUMO

Os dados de 135 pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide em atendimento no Hospital das Clínicas da UNICAMP, na Disciplina de Endocrinologia, foram analisados com o objetivo de caracterizar esta população, observar a freqüência de achados clínicos e anatomopatológicos, e verificar a relação dos mesmos com o prognóstico.

Existe na literatura relatos da influência de proto-oncogenes e de genes supressores tumorais na evolução de diversas neoplasias. Por este motivo estudamos também a expressão do PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) e das proteínas p53 e bcl-2 em parte da nossa casuística e procuramos verificar se estes achados eram significativos na evolução destes casos. Os estudos imuno-histoquímicos foram realizados de acordo com a técnica de HSU e cols. (1981), modificada. Os testes estatísticos empregados foram: exato de Fisher, Qui-quadrado, Mann-Whitnney, curvas de sobrevida de Kaplan-Meier e Log Rank. Foram também realizadas análises univariada e multivariada.

Os resultados mostraram que os carcinomas foram folicular em 28.9% e papilífero em 71.1% dos pacientes; 78.5% eram do sexo feminino e 21.5% do masculino; a idade ao diagnóstico variou entre 9 e 76 anos (média=42.5; DP=17.1 e mediana=43). Quando separados pelo tipo histológico, observamos para os 96 casos de carcinoma papilífero: 75 (78.1%) do sexo feminino e 21 (21.9 %) do masculino; 87 (90.6%) brancos e 9 (9.4%) não brancos; 68 (70.8%) tinham idade menor ou igual a 45 anos e 28 (29.2%) maior que 45 anos; a idade ao diagnóstico variou entre 9 e 75anos (média=37.3 anos, DP=15.4 e mediana=35.5), e para os 39 carcinomas foliculares: 31 (79.5%) do sexo feminino e 8 (20.5 %) do masculino; 30 (76.9%) brancos e 9 (23.1%) não brancos; 8 (20.5%) tinham idade menor ou igual a 45 anos e 31 (79.5%) maior que 45 anos; a idade ao diagnóstico variou entre 20 e 76 anos (média=55.4 anos, DP=14.3 e mediana=58).

O tamanho do nódulo variou entre 0.4 e 11 cm: nos papilíferos entre 0.4 e 7cm (média=3; DP=1.6; mediana 3) e nos foliculares entre 1.5 e 11cm (média=5.5; DP=2.4; mediana=5). Encontramos associações significativas entre: idade e tipo histológico; idade e grau de diferenciação do tumor; tamanho do nódulo e tipo histológico; tamanho do nódulo e grau de diferenciação; metástases ao diagnóstico e tipo histológico folicular; metástases ao diagnóstico e grau de diferenciação; ocorrência de eventos e tipo histológico folicular; ocorrência de eventos e grau de diferenciação. Utilizando-se a medida contínua dos nódulos notamos que foram maiores no grupo com idade maior que 45 anos, tanto no papilífero quanto no folicular. Quando comparadas as curvas de sobrevida (Log Rank) foi notada a influência das variáveis: idade, tamanho do nódulo, tipo histológico e grau de diferenciação. Na análise univariada as variáveis idade, tamanho do nódulo, tipo histológico e grau de diferenciação foram as que melhor explicaram a ocorrência de eventos (regressão de metástases, remissão incompleta, recidiva ou metástases e morte). Na análise multivariada os fatores sexo, idade e grau de diferenciação mostraram ser os mais importantes na ocorrência de eventos.

Em parte da nossa casuística, 63 casos, sendo 42 do tipo papilífero e 21 do folicular, avaliamos a expressão do PCNA e das proteínas p53 e bcl-2, procurando verificar se estavam relacionadas à evolução dos casos. Concluímos que os marcadores estudados não apresentaram influência no prognóstico do carcinoma diferenciado da tireóide, e que nestas neoplasias os fatores anteriormente estabelecidos (idade, tamanho do nódulo, tipo histológico, grau de diferenciação) são os mais importantes.

INTRODUÇÃO

O carcinoma da tireóide é um tumor relativamente raro, e causa poucas mortes.

Em 1993, nos Estados Unidos, a incidência do câncer de tireóide foi estimada em 13900 casos, constituindo 1.1% de todos os canceres, excluídos os de pele. A glândula tireóide é a sede de apenas 0.6% e 1.6% dos canceres entre homens e mulheres respectivamente. O câncer de tireóide apresenta um bom prognóstico, sendo responsável por baixa porcentagem de mortes - 0.16% para homens e 0.24% para as mulheres (BORING, SQUIRES, TONG , 1993).

A incidência do carcinoma de tireóide varia entre 1 e 10 casos por 100 000 pessoas na maioria dos países. O carcinoma diferenciado da tireóide corresponde a aproximadamente 90% de todos os tumores de tireóide, sendo que o carcinoma papilífero da tireóide representa a maioria destes. A proporção relativa entre os carcinomas papilífero e folicular mostra ampla variação geográfica. Entretanto, em áreas de bócio endêmico, o carcinoma folicular da tireóide tende a ser mais freqüente podendo variar entre 10 e 50% (GREBE & HAY, 1995).

O carcinoma diferenciado da tireóide é usualmente um câncer indolente, porém em alguns casos pode ser agressivo, especialmente em pacientes com mais de 50 anos (DULGEROFF & HERSHMAN, 1994). Este comportamento mais agressivo de alguns tumores tem sido objeto de muitos estudos, na procura de variáveis que o justifiquem.

WOOLNER *et al.* (1961) questionaram pela primeira vez os fatores prognósticos para o carcinoma de tireóide. A análise dos fatores de risco popularizou-se nos Estados Unidos com as publicações de CADY *et al.* (1979) e CADY *et al.* (1985).

Entre todos os fatores de risco analisados, a idade do paciente na ocasião do diagnóstico é considerada a variável mais importante para os carcinomas diferenciados da tireóide. CADY *et al.* (1976) mostraram que o risco de morte pela doença aumenta com a

idade, e que a ascensão da mortalidade é ainda mais dramática após os 60 anos. Entretanto este padrão é muito diferente para as recidivas do tumor, sendo mais elevadas nos extremos da vida, antes dos 20 anos e após os 60 anos (MAZZAFERRI & JHIANG, 1994).

SIMPSON *et al.* (1987) consideram a idade ao diagnóstico o fator mais importante como causa específica na sobrevida de pacientes com carcinoma papilífero, mas entre os carcinomas foliculares a idade representa um fator significativo, porém de menor importância. Para GILLILAND *et al.* (1997), ao contrário, a idade ao diagnóstico foi o dado de maior importância para predizer a sobrevida de pacientes com carcinoma folicular e medular do que para a dos pacientes com carcinoma papilífero.

Ainda não se entende muito bem porque o adulto jovem tem melhor prognóstico do que os mais idosos. Observa-se que, em geral, os pacientes mais velhos têm tumores com maior agressividade local, alta incidência de metástases a distância ao diagnóstico e variantes histológicas mais agressivas (SCHLUMBERGER & PACINI, 1999).

O papel do sexo como um fator prognóstico é controverso. Para TUBIANA *et al.* (1985) os homens têm prognóstico menos favorável do que as mulheres, mas a diferença é pequena. MAZZAFERRI (1996) relata que o risco de morte pelo câncer é aproximadamente duas vezes maior nos homens.

CADY *et al.* (1979) utilizando apenas a idade e o sexo, para definir o risco básico, consideraram como baixo risco homens abaixo de 40 anos e mulheres abaixo de 50 e alto risco homens acima de 40 anos e mulheres acima de 50. Mostraram que a recorrência e morte era 33% e 27%, respectivamente, no grupo de alto risco, contra 11% e 4% no de baixo risco. Estudaram também a importância de outros fatores como: tipo histológico, tamanho do tumor, metástase em linfonodo, metástase a distância e grau de diferenciação. Concluíram que o risco básico é mais importante do que os outros fatores. Mostraram ainda que, em pacientes mais jovens, não existe influência do tipo histológico e da presença de

metástases para linfonodos sobre a recorrência e morte, como haviam concluído em publicação anterior.

Em geral, o prognóstico do carcinoma papilífero é melhor que o do folicular. O pior prognóstico do carcinoma folicular está mais relacionado à idade do paciente e à extensão do tumor ao diagnóstico do que ao tipo histológico. DeGROOT *et al.* (1990, 1995) analisaram grupos de pacientes portadores de carcinoma folicular e papilífero, que foram acompanhados por mais de 10 anos, e relataram diferenças importantes entre os grupos: no grupo dos carcinomas foliculares a idade ao diagnóstico foi mais elevada e a morte pelo tumor ocorreu em idade mais baixa. Mesmo os tumores menores e intra-tireoideanos mostraram pior prognóstico e a morte pelo tumor foi duas vezes maior neste grupo.

Em 1984, DONOHUE *et al.* mostraram que não há diferença na sobrevida de pacientes com carcinoma papilífero e carcinoma folicular quando a idade e estágio do tumor ao diagnóstico são semelhantes.

Num mesmo tipo histológico pode haver diferença de prognóstico entre as suas variantes. Nos carcinomas papilíferos tem sido reportado pior prognóstico para as variantes de células altas, de células colunares e oxifílicas, prognóstico intermediário na variante esclerosante difusa e o melhor nas variantes encapsulada e folicular (AIN, 1995; SCHLUMBERGER & PACINI, 1999). No carcinoma folicular, o minimamente invasivo tem melhor prognóstico do que o francamente invasivo e a variante de células de Hürthle está associada a pior prognóstico (GREBE & HAY, 1995; SCHLUMBERGER & PACINI, 1999).

Outro fator analisado foi o grau de diferenciação do tumor. SAKAMOTO, KASAI, SUGANO (1983) analisaram 221 pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide e concluíram que o grau de diferenciação do tumor é mais importante do que o tipo histológico. Os carcinomas pobremente diferenciados, que representam 13.6% do total dos carcinomas, apresentam pior prognóstico do que os carcinomas bem diferenciados. Estes

resultados estão de acordo com os resultados de PAPOTTI *et al.* (1993), onde as curvas de sobrevida de pacientes com carcinoma pobremente diferenciado são significativamente diferentes das curvas encontradas nos carcinomas bem diferenciados.

Existe uma grande variação no tamanho do tumor primário, e este é um fator de risco significativo nas análises multivariadas. Porém, ele é mais importante nos carcinomas papilíferos do que nos foliculares, pois nestes o grau de diferenciação e invasão prevalecem sobre o tamanho (SAKAMOTO *et al.*, 1983; TUBIANA *et al.*,1985; SIMPSON *et al.*, 1987). CADY & ROSSI (1988) e DeGROOT *et al.* (1990, 1995) mostraram que existe um aumento gradual no risco de recorrência e mortalidade pelo tumor relacionado com o tamanho do tumor primário. Depois da introdução da ultra-sonografia e da biópsia aspirativa por agulha fina na prática clínica, é freqüente o diagnóstico de tumores pequenos (CADY, 2000; HUNDAHL *et al.*, 2000).

Não existe dúvidas de que a extensão do tumor além da cápsula da tireóide seja um indicador de pior prognóstico, tanto para o carcinoma papilífero como para o folicular. Esta extensão é descrita em 5-10% dos papilíferos e 3-5% dos foliculares e, quando presente, expõe o paciente a altas taxas de recorrência local, metastáses a distância e morte pelo tumor (DeGROOT *et al.*, 1990,1995; MAZZAFERRI & JHIANG, 1994; SIMPSON *et al.*, 1987).

CARCANGIU *et al.* (1985) encontraram tumor multicêntrico em 21.9% dos carcinomas papilíferos e os pacientes apresentaram maior incidência de metástases para linfonodos e pulmões.

Metástases para linfonodos são freqüentes no carcinoma papilífero, variando de 35% a 65% em diferentes séries. São mais comuns em crianças e adultos jovens, ocorrendo em 80% dos carcinomas papilíferos, mas no tipo histológico folicular são muito pouco freqüentes (GREBE & HAY, 1996).

O papel prognóstico das metástases para linfonodos regionais é ainda controversa. CADY *et al.* (1985) correlacionaram a presença de linfonodos cervicais ao diagnóstico com bom prognóstico, principalmente nos pacientes mais jovens. CARCANGIU *et al.* (1985) consideraram como um fator que não influencia o prognóstico e TUBIANA *et al.* (1985) afirmaram que estão associados a pior prognóstico.

Em 1996, GREBE & HAY, mostraram que nos carcinomas papilíferos a presença de metástases em linfonodos ao diagnóstico não apresenta efeito na sobrevida, mas aumenta o risco de recorrência local. Em contraste, no folicular pode apresentar influência na mortalidade pelo tumor.

Existe consenso quanto à presença de metástases a distância ao diagnóstico como um fator de pior prognóstico tanto no carcinoma papilífero como no folicular. Ocorrem em 10% a 15% dos pacientes com carcinomas diferenciados da tireóide (SCHLUMBERGER & PACINI, 1999). SHAH *et al.* (1992) encontraram metástases a distancia ao diagnóstico em 13% dos carcinomas foliculares e em 3% dos papilíferos.

A melhora das técnicas de imuno-histoquínica (IHQ) em anatomopatologia e os avanços da biologia molecular no estudo genético do câncer, avaliando o papel dos proto-oncogens e de genes supressores tumorais, tem trazido novas perspectivas para a busca de marcadores prognósticos em oncologia (BISHOP, 1987; FARID, SHI, ZOU, 1994,1995).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi primeiramente descrito por MIYACHI, FRITZLER, TAN (1978) em células proliferativas de pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico. O PCNA é um polipeptídeo intranuclear com peso molecular de 36kD, presente em todas as fases do ciclo celular, atingindo o máximo de sua síntese, cerca de três vezes a sua concentração, durante a fase S do ciclo e a menor quantidade durante as fases G1 e G2 da mitose (BRAVO & CELIS, 1980). Em 1984, foi designado como Ciclina-D por CELIS *et al.*, através da observação do aparecimento desta proteína nuclear durante estágios proliferativos do ciclo celular das células normais e transformadas. A estrutura e

seqüência do gene humano para o PCNA, que possui 6 exons, foi elucidada por TRAVALI *et al.* (1989). O PCNA é uma proteína acessória da polimerase delta, necessária para a síntese de DNA e conseqüente progressão do ciclo celular (LEE & HURWITZ, 1990; WASSEM & LANE, 1990).

Em 1993, SHIMIZU *et al.* avaliaram a capacidade proliferativa dos tumores de tireóide utilizando técnicas de IHQ para o PCNA. Encontraram porcentagens mais elevadas de positividade para o PCNA em carcinomas bem diferenciados do que em adenomas, bócios adenomatosos e em tecido tireoideano normal. Não houve diferença significativa entre o carcinoma papilífero e o folicular. Mostraram que havia maior porcentagem de positividade para o PCNA nos tumores clinicamente mais agressivos (indiferenciados).

SOARES & SOBRINHO SIMÕES (1994) referiram que existe maior porcentagem de positividade para o PCNA apenas nos carcinomas indiferenciados, pois não encontraram diferença significativa entre lesões benignas (adenoma e bócio adenomatoso) e carcinomas bem diferenciados.

TATEYAMA *et al.* (1994) estudaram a expressão do PCNA em 52 casos de tumor folicular da tireóide e encontraram diferença estatisticamente significativa entre adenoma folicular e carcinoma folicular minimamente invasivo e entre adenoma folicular e carcinoma folicular francamente invasivo, porém não houve diferença entre carcinoma folicular minimamente invasive carcinoma folicular francamente invasivo.

CZYZ *et al.* (1994) estudaram a expressão do PCNA em tumor folicular (adenoma folicular e carcinoma folicular), avaliando a porcentagem de positividade e a intensidade de coloração, e não encontraram diferença na porcentagem de positividade para o PCNA entre adenomas e carcinomas, mas a intensidade de coloração era maior nos carcinomas.

POLLINA *et al.* (1996) não encontraram diferença estatística na expressão do PCNA entre os adenomas, carcinomas bem diferenciados, carcinomas pobremente

diferenciados e carcinoma medular. Entretanto, os carcinomas indiferenciados mostraram expressão de PCNA significativamente maior quando comparada com a dos outros tipos histológicos.

Outro gene muito estudado, por estar envolvido na maiorias dos carcinomas, é o p53. O gene p53, que codifica uma proteína de 53 kD (393 aminoácidos) identificada por LANE & CRAWFORD (1979), foi posteriormente clonada e mapeada na região p13 do cromossomo17 - 17p13 (McBRIDE, MERRY, GIVOL, 1986). O gene tem o comprimento de 20Kb, possui 11 éxons e cinco áreas de domínio. O domínio central II, III, IV e V, vai do aminoácido 101 ao 290 e corresponde à área da transcrição, sendo o local onde ocorrem os maiores pontos de mutações, principalmente entre os éxons de 5 a 8 (LEVINE, MOMAND, FINLAY, 1991; HOLLSTEIN *et al.*, 1991; WRIGHT *et al.*, 1991; HARRIS & HOLLSTEIN 1993; BARGONETTI *et al.*, 1993; LEVINE *et al.*, 1994; FARID, ZOU SHI, 1995).

O gene p53 está presente em todos os seres vivos (SOUSSI, CARON DE FROMENTAL, MAY, 1990) e é conhecido como guardião do genoma. Atua como supressor, sendo ativado quando há dano ao DNA, promovendo reparo a esta molécula ou caso não seja possível, induzindo a célula à apoptose (LANE, 1994). Na IHQ, a proteína do gene p53 é identificada no núcleo celular apenas quando ocorre mutação, uma vez que a forma selvagem tem vida média muito curta e a mutante apresenta vida suficientemente longa, para ser detectada (HARRIS & HOLLSTEIN, 1993; HALL & LANE, 1994; LINDEN, NATHANSON, ZARBO, 1994 e 1995).

As mutações que ocorrem nos tumores são de dois tipos, a *missense*, onde ocorre uma troca na transcrição entre uma base nitrogenada e outra, produzindo uma proteína alterada, e a mutação *nonsense*, na qual ocorre a troca de um codon completo, gerando uma proteína totalmente truncada, muitas vezes não detectável na IHQ pelo seu grau de alteração (WYNFORD-THOMAS, 1992; BATTIFORA, 1994; HO *et al.*,1996).

As mutações do gene p53 parecem ser relevantes no desenvolvimento e progressão do tumor maligno da tireóide (NAKAMURA *et al.*, 1992; ITO *et al.* (1993).

Existem cerca de 2 500 mutações do gene p53 publicadas. Podem ser encontradas em tumores de cólon, pulmão, mama, cérebro, fígado, bexiga, próstata, esôfago, linfomas e algumas leucemias (NIGRO *et al.*, 1989; SOUSSI *et al.*, 1994).

Os estudos realizados por WRIGHT (1991) na detecção da proteína p53 por IHQ em 129 casos de neoplasia de tireóide (57 adenomas foliculares, 24 carcinomas foliculares, 28 carcinomas papilíferos e 20 carcinomas indiferenciados) foram surpreendentemente negativos.

DONGHI *et al.* (1993) estudaram 52 pacientes, detectando a proteína p53 em 25% dos carcinomas pobremente diferenciados e em 71.5% dos carcinomas indiferenciados, mas em nenhum carcinoma bem diferenciado.

ITO *et al.* (1992) descrevem mutações do p53 associadas unicamente aos carcinomas indiferenciados da tireóide .

SOARES, CAMESELLE-TEIJEIRO, SOBRINHO-SIMÕES (1993) analisaram a imuno-expressão da proteína p53 em 14 lesões benignas e em 65 carcinomas, e observaram a sua positividade em 20% de carcinomas foliculares invasivos, 16.1% de carcinomas pobremente diferenciados e 83.3% de carcinomas indiferenciados.

ZOU, SHI, FARID (1993) detectaram a proteína p53 em carcinomas diferenciados e indiferenciados, mas não em adenomas.

FAGIN *et al.* (1993) descreveram alta prevalência de mutação do gene p53 em carcinomas pobremente diferenciados.

FARID, SHI, ZOU (1994) e JOSSARD *et al.* (1996), sugerem que exista um modesto papel do gene supressor p53 no carcinoma folicular em curso tardio da doença.

CARR *et al.* (1993) estudaram o padrão de coloração por IHQ de 104 casos de neoplasia de tireóide e detectaram acúmulo da proteína p53 em 38% dos carcinomas indiferenciados, 6% dos carcinomas papilíferos e em 50% dos carcinomas foliculares.

DOBASHI *et al.* (1993) mostraram que a imuno-reatividade da proteína p53 nos carcinomas de tireóide está significativamente associada com o subtipo histológico pobremente diferenciado. Notaram, também, que havia maior porcentagem de positividade nos carcinomas que apresentam comportamento mais agressivo (carcinomas pobremente diferenciados e carcinomas indiferenciados).

WRIGHT *et al.* (1993) acreditam que as mutações do p53 devam aparecer como um evento tardio da oncogenese.

POLLINA *et al.* (1996) avaliaram a positividade de p53 em 40 adenomas, 134 carcinomas (70 carcinomas bem diferenciados, 20 carcinomas pobremente diferenciados, 20 carcinomas medulares e 24 carcinomas indiferenciados) e em tecido tireoideano normal. Mostraram que o tecido normal e os adenomas não expressam a proteína p53. Entretanto, encontraram-na em 11.4% dos carcinomas bem diferenciados (focal), em 5% dos carcinomas pobremente diferenciados (difuso), em 62.5% dos carcinomas indiferenciados (difuso) e em 5% dos carcinomas medulares (focal). Nos carcinomas bem diferenciados e carcinomas medulares os núcleos positivos são geralmente limitados a focos dispersos de células, porém nos carcinomas pobremente diferenciados e nos indiferenciados, quando positivos, mostram padrão forte e difuso de coloração.

NISHIDA *et al.* (1996) estudaram pacientes com carcinomas pobremente diferenciados e concluíram que aqueles que apresentavam a imuno-reação positiva para o p53 (56%) tiveram prognóstico pior.

Descoberto há mais de 10 anos, o proto-oncogene bcl-2 foi o primeiro relacionado com a malignidade tumoral. É encontrado numa translocação entre os cromossomos 14 e 18 – t(14,18) - (TSUJIMOTO *et al.*, 1985), atuando como inibidor da apoptose celular e programando a morte das células em modelos transgênicos (REED, 1994; VAUX, WEISSMAN, KIM, 1992). Codifica uma proteína de 239 aminoácidos de 25kD, com um longo íntron de 225Kb separando dois éxons e tem localização intracelular, especificamente na membrana celular das mitocôndrias (KORSMEYER, 1992). Encontra-se distribuído em vários tecidos adultos, incluindo tecidos linfóides, hematopoiéticos, epiteliais e neurais. Entretanto, a sua expressão é limitada às áreas topográficas e a tipos celulares com pequenas quantidades, consideradas normais para a vida celular (HOCHNBERY *et al.*, 1991; MERRY *et al.*, 1994; HOCHNBERY, 1995). Na IHQ, a proteína expressa pelo bcl-2 encontra-se no citoplasma celular.

Uma série de tumores tem relação prognóstica com a presença do bcl-2, entre eles os hematopoiéticos (ZUTTER *et al.*, 1991), principalmente os linfomas foliculares, que expressam até 85% de positividade (NGAN *et al.*, 1993; PEZZELLA *et al.*, 1990 e 1993b), o câncer de próstata (COLOMBEL *et al.*, 1993), o câncer de pulmão (PEZZELLA, TURLEY, KUZU, 1993a; FONTANINI *et al.*, 1995), os tumores do trato gastrointestinal (BRONNER *et al.*, 1995) e os tumores de ovário (HEROD *et al.*, 1996).

PILOTTI *et al.* (1994a) estudaram a proteína bcl-2 na glândula tireóide, que é um tecido hormônio dependente, verificando que o bcl-2 está presente nas células foliculares que podem ser definidas como "célula estável", usualmente com baixo índice mitótico. No carcinoma de tireóide foi visto que a expressão do bcl-2 está relacionado à diferenciação celular. A proteína bcl-2 foi detectada em alta porcentagem tanto nos carcinomas bem diferenciados (78.7%) como nos carcinomas pobremente diferenciados (84.2%) e em apenas 14% dos indiferenciados. Entretanto, no carcinoma indiferenciado com um componente diferenciado foi observada mútua exclusão do bcl-2 e p53, encontrando-se bcl-2- e p53+ no componente indiferenciado e bcl-2+ e p53– no componente diferenciado.

Mostraram que existe uma correlação inversa entre a expressão do bcl-2, a perda da diferenciação e a progressão tumoral. Sendo o carcinoma indiferenciado o de maior agressividade entre os carcinomas de tireóide, os achados acima estão de acordo com publicações anteriores que sugerem que a expressão do bcl-2 está associada ao comportamento menos agressivo no carcinoma de pulmão (PEZZELA *et al.*, 1993a) e linfomas malignos (PEZZELA *et al.*, 1993b).

PILOTTI *et al.* (1994b) estudaram, ainda, a expressão das proteínas bcl-2 e p53 em 41 pacientes com neoplasia de tireóide: 19 carcinomas pobremente diferenciados e 22 carcinomas indiferenciados. Observaram resultado positivo para o bcl-2 em 84.2% dos carcinomas pobremente diferenciados e 13.6% dos carcinomas indiferenciados e para o p53 em 52.6% e 54.5% respectivamente, porém a distribuição foi focal nos carcinomas pobremente diferenciados e difusa nos carcinomas indiferenciados.

PEZZELLA & GATTER (1995) descrevem a expressão da proteína bcl-2 em tecidos normais e neoplásico. Na tireóide, as células epiteliais do folículo mostraram o citoplasma corado para o bcl-2. No carcinoma folicular a expressão de bcl-2 apresentou correlação com a presença de tireoglobulina e perdeu a correlação em áreas tumorais indiferenciadas e pobremente diferenciadas, as quais passaram a apresentar coloração nuclear para o p53. Acreditam que o valor da imunocoloração para o bcl-2 ainda não está claro, mas promete ser um importante marcador clínico em algumas doenças, quando seu papel for completamente entendido.

OBJETIVOS

- Verificar aspectos clínicos, anatomopatológicos, laboratoriais e evolutivos em uma população portadora de carcinoma diferenciado da tireóide.

- Detectar, por meio de reação imuno-histoquímica, os antígenos PCNA, e as proteínas p53 e bcl-2, verificando sua freqüência na população estudada.

- Correlacionar os achados com o prognóstico e a sobrevida nos carcinomas diferenciados da tireóide.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Foram estudados 135 pacientes submetidos a tireoidectomia total por carcinoma papilífero ou folicular da tireóide, atendidos no ambulatório da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, no período de janeiro de 1986 a janeiro de 1999. Destes, 106 eram do sexo feminino e 29 do sexo masculino, 117 de cor branca e 18 de cor não branca (TABELA 1).

TABELA 1 – Distribuição dos 135 pacientes de acordo com sexo e cor

	Feminino Branco	**Feminino Não Branco**	**Masculino Branco**	**Masculino Não Branco**	**TOTAL**
Papilífero	67	8	20	1	**96**
Folicular	23	8	7	1	**39**
TOTAL	**90**	**16**	**27**	**2**	**135**
		106		**29**	

Na primeira consulta de cada paciente foi preenchida uma ficha padrão onde constava, além dos dados de identificação, a idade ao diagnóstico, sexo, cor, dados clínicos pré cirúrgicos, ultra-som, cintilografia da tireóide, biópsia aspirativa, dados referentes à cirurgia, dados do exame anatomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação, presença de linfonodos regionais acometidos). Essa ficha era completada à cada consulta, anotando-se a presença ou não de metástase a distância na data da cirurgia (detectadas pela pesquisa de corpo inteiro com iodo – PCI, até 8 meses após); resultados de exames laboratoriais de controle (tiroxina livre, TSH, Tireoglobulina sérica e anticorpos anti-Tireoglobulina) executados pelo Laboratório Central do HC - UNICAMP; resultados da PCI; da dose de radiodoterapia. Foram anotados também eventos mais tardios como aparecimento de metástases e morte em decorrência do tumor (ANEXO 1).

A idade dos pacientes na data da cirurgia variou entre 9 e 76 anos, mas eles foram separados em dois grupos: menor ou igual a 45 anos (75 pacientes) e maior que 45 anos (60 pacientes), conforme o preconizado pelo Manual for Staging of Cancer-TNM (BEAHRS *et al.*, 1992).

A TABELA 2 relaciona os pacientes pela faixa etária e sexo.

TABELA 2 – Distribuição dos 135 pacientes de acordo com a faixa etária e sexo

	Feminino ≤ 45 a	**Masculino ≤ 45 a**	**Feminino > 45 a**	**Masculino > 45 a**	**TOTAL**
Papilífero	54	14	21	7	**96**
Folicular	7	0	24	8	**39**
TOTAL	**61**	**14**	**45**	**15**	**135**
	75 (55,5%)		60 (44,5%)		

A medida do tumor em cm tomou como base o laudo anatomopatológico e, para os tumores multicêntricos, foi considerado o tumor maior. Seguindo a determinação do Manual for Staging of Cancer-TNM, os nódulos foram agrupados em menor ou igual a 4cm e maior que 4cm. Esta informação foi possível em 121 pacientes (TABELA 3).

TABELA 3 – Distribuição de 121 pacientes de acordo com o tamanho do tumor

	≤ 4cm	**> 4 cm**	**TOTAL**
Ca Papilífero	67	21	**88**
Ca Folicular	10	23	**33**
TOTAL	**77**	**44**	**121**

Para verificar se haveria diferença no comportamento biológico dos tumores, os carcinomas foram re-classificados em bem diferenciados (66 casos), moderadamente (31 casos) e pouco diferenciados (11 casos), após revisão das lâminas de cada caso, pela autora, sob supervisão da orientadora, utilizando os parâmetros propostos por LiVOLSI em 1990 (TABELA 4).

TABELA 4 – Distribuição de 108 pacientes de acordo com o grau de diferenciação tumoral

	Bem diferenciados	Moderadamente diferenciados	Pouco diferenciados	TOTAL
Ca Papilífero	54	18	3	**75**
Ca Folicular	12	13	8	**33**
TOTAL	**66**	**31**	**11**	**108**

A informação de metástase em linfonodo foi considerada positiva ou negativa apenas quando havia esta informação de maneira muito clara no laudo anatomopatológico.

Para detecção de metástase a distância foi realizada PCI com Iodo 131. Quando positiva, foi considerada metástase ao diagnóstico se realizada até 8 meses após a cirurgia. Em 2 casos, em que os tumores não captavam iodo, foram utilizadas ultra-sonografia cervical, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética para confirmar as metástases.

Na TABELA 5 estão relacionadas as informações de metástases ao diagnóstico de 115 pacientes.

TABELA 5 - Distribuição de 115 pacientes de acordo com as metástases ao diagnóstico

	Não apresentaram	Linfonodo Regional	Metástases a Distância	TOTAL
Papilífero	30	40	11	**81**
Folicular	19	2	13	**34**
TOTAL	**49**	**42**	**24**	**115**

Cada paciente foi considerado *Em remissão* (ER), quando não apresentou nenhuma metástase; *Sem doença aparente* (SDA) quando havia concentração sérica de tireoglobulina elevada, porém sem detecção de metástase ou ainda nos casos em que as metástases não foram mais detectadas após a dose terapêutica de ^{131}Iodo; *Sem remissão completa* (SRC) quando já havia metástases ao diagnóstico e estas continuaram detectáveis após a dose de radiodo; *Recidiva* (R) quando estes eventos ocorreram após um período de seguimento livre de doença e *Morte* (M) quando esta aconteceu em decorrência do tumor.

Na TABELA 6 estão relacionadas as informações sobre a evolução dos pacientes.

TABELA 6 - Distribuição de 132 pacientes de acordo com a evolução

	Em Remissão	**Sem Doença Aparente**	**Sem Remissão Completa**	**Recidiva ou Metástases**	**Morte**	**TOTAL**
Papilífero	64	5	16	10	0	**95**
Folicular	15	0	15	4	3	**37**
TOTAL	**79**	**5**	**31**	**14**	**3**	**132**

O tempo de seguimento foi considerado em meses após o diagnóstico. Todos os pacientes após serem submetidos a tireoidectomia total receberam reposição hormonal com L-tiroxina em dose adequada para manter o TSH suprimido.

Não foram incluídas no presente estudo neoplasias indiferenciadas, anaplásicas e de outras linhagens celulares.

Em vista da diversidade de resultados na literatura, resolvemos aplicar em parte da nossa casuística estudo imuno-histoquímico para avaliar sua validade na determinação do prognóstico dos pacientes com neoplasia folicular e papilífera da tireóide.

Desta forma, um subgrupo de 63 tumores, 42 papilíferos e 21 foliculares, foi submetido a estudo imuno-histoquímico para verificar a expressão de PCNA, e das proteínas p53 e bcl-2. As características desta população estão detalhadas no ANEXO 4.

METODOLOGIA

A coleta de dados clínicos, laboratoriais e evolutivos foi realizado pela autora por análise retrospectiva dos prontuários médicos.

CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A classificação histológica foi conferida pela autora, supervisionada pela orientadora, segundo a proposta da Organização Mundial de Saúde (HEDINGER, WILLIAMS, SOBIN, 1989) e seguindo os parâmetros clássicos (LiVOLSI, 1990; ROSAI, CARCANJIU, DeLELLIS, 1992).

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada pela autora no Laboratório de Patologia Experimental (LAPE) do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM)-UNICAMP.

Os blocos de parafina foram recuperados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP. Para cada caso, do bloco que apresentava material mais representativo, foram feitos cortes para estudo imuno-histoquímico, por meio da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU *et al.* 1981), modificada. Todas as peças cirúrgicas foram fixadas em formalina.

Resumidamente, os cortes parafinados de 5μm de espessura foram colocados em lâminas de vidro previamente silanizadas. Após a desparafinação em xilol e a hidratação em gradiente decrescente de álcool, as lâminas foram lavadas em água destilada e submetidas à inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em tampão PBS pH 7.6. A recuperação antigênica do p53 e PCNA foi feita pela imersão das lâminas em tampão citrato 0.01M em pH 6.0, e em ebulição em microondas caseiro, potência máxima por três vezes, sete minutos cada. A recuperação antigênica do bcl-2 foi feita em água destilada na autoclave, após atingir 120°C por cinco minutos e ter deixado esfriar por uma hora. Em seguida realizou-se a incubação dos cortes com anticorpos primários (citados abaixo) por toda a noite, em geladeira a 4°C, em câmara úmida. Na manhã seguinte, os cortes foram cuidadosamente lavados em tampão PBS pH 7.6 e incubados com anticorpo anti-imunoglobulinas de camundongo, coelho e cabra biotinado (Multilink, DAKOPATS-USA, código E 435) diluição 1:80, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem dos cortes, estes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKOPATS-USA, código K 377). A visulização dos complexos foi feita pela coloração da peroxidase com diaminobenzidina (3,3′ tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina, SIGMA, código D5637), 40 mg em 100 mL de PBS pH 7.6 com 40 μL de peróxido de hidrogênio a 30%. Nesta solução corante os cortes foram deixados por três a cinco minutos à temperatura ambiente. A coloração nuclear foi feita com a hematoxilina de Meyer e os preparados montados permanentemente com Entellan MERCK (código 7961).

Os anticorpos primários utilizados foram:

- ✓ proteina p53 (clone D0 7, DAKOPATS-USA, código M 7001, diluição1:100)
- ✓ proteina bcl-2 (clone 124, DAKOPATS-USA, código M 0887, diluição1:40)
- ✓ PCNA-(clone PC 10 DAKOPATS-USA, código M 879, diluição1:150)

Utilizou-se sempre tecido padrão para controle de imunopositividade.

Os preparados imuno-histoquímicos foram analisados em microscópio óptico comum (objetiva de 40 vezes) e as células reativas foram quantificadas com o seguinte critério:

- ♦ Para a avaliação da expressão do PCNA foi utilizada uma ocular reticulada e contados os núcleos de 500 células, em vários campos onde se observasse maior positividade ("hot spots") e calculada a porcentagem. Para a análise estastatística foram considerados positivos os casos com porcentagem maior que 20.

- ♦ Para o p53 e bcl-2 foram considerados positivos os casos com qualquer grau de expressão dos marcadores nuclear e citoplasmático, respectivamente.

Não foram incluídos os casos em que as 3 reações de imuno-histoquímica eram negativas e que apresentasse a reação para Vimentina negativa

Todos os resultados da análise da imuno-histoquímica foram conferidos por um mesmo patologista (co-orientador).

Foi utilizado como controle, para as reações de imuno-histoquímica, um grupo de 15 pacientes, sendo 11 portadores de nódulo benigno de tireóide (6 adenomas e 5 bócio colóide) e 4 de tecido tireoideano normal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com a colaboração da Comissão de Pesquisa (Serviço de Estatística) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Foi realizada análise descritiva das variáveis, utilizando tabelas de freqüências para as variáveis em estudo e tabelas de dupla entrada para os cruzamentos de interesse.

Para compararmos a variável tamanho do nódulo e idade nos grupos: masculino e feminino, folicular e papilífero, utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney (ou teste de Wilcoxon), que compara dois grupos em função da soma dos postos das observações. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando o p-valor do teste aplicado foi $\leq 0,05$ (CONOVER, 1971).

Para verificar se existia associação entre as variáveis foi utilizado o teste Qui-quadrado, e quando os valores esperados foram menores que 5 utilizou-se o teste exato de Fisher, sendo considerada significativa a associação quando o valor $p \leq 0.05$ (FLEISS, 1981; SIEGEL, 1975).

Foi utilizado o estimador de Kaplan-Meier para as curvas de sobrevida das variáveis idade, sexo, cor, tamanho do nódulo, tipo histológico, grau de diferenciação, presença de metástases ao diagnóstico, PCNA, p53 e bcl-2, considerando-se como evento as variáveis: não houve remissão completa, houve recidiva ou metástases e morte (KAPLAN & MEIER, 1958). Para comparar as curvas de sobrevida de cada grupo foi utilizado o teste Log-Rank. As curvas foram consideradas estatisticamente diferentes quando o p-valor do teste aplicado foi $\leq 0,05$ (COLLETT, 1994).

Utilizamos o modelo de regressão de Cox para determinar quais as variáveis que melhor explicam a ocorrência dos eventos. Este tipo de análise, usada em estudos de sobrevida, é uma adaptação do modelo de regressão múltipla com incorporação de dados censurados, onde a variável dependente é o tempo até a ocorrência de um determinado evento.

Para este modelo supõe-se que cada indivíduo do estudo apresenta, além do tempo de sobrevida, uma ou mais variáveis exploratórias (X_1, X_2,.., X_n) medidas no tempo de início. Desta forma, esta regressão permite conhecer os fatores significativamente associados à distribuição do tempo de sobrevivência.

Foi aplicado o modelo proposto por Cox, conhecido como modelo de riscos proporcionais (COLLETT, 1994), que utilizou como variável resposta o tempo de seguimento, em meses, e as variáveis independentes: idade, sexo, cor, tamanho do nódulo, tipo histológico, grau de diferenciação e PCNA, p53 e bcl-2 (para o grupo em que se realizaram as reações de imuno-histoquímica).

RESULTADOS

A população estudada, 135 casos de carcinoma diferenciado de tireóide, é composta por 96 do tipo papilífero (71.1%) e 39 do folicular (28.9%).

A idade ao diagnóstico variou entre 9 e 76 anos (média de 42.5 anos, DP de 17.1 e mediana de 43). Quando separados pelo tipo histológico, foi observada a variação da idade entre 9 e 75 anos (média = 37.3 anos, DP = 15.4 e mediana = 35.5) para os papilíferos, e entre 20 e 76 anos (média = 55.4 anos, DP = 14.3 e mediana = 58) para os foliculares. Notamos picos de diagnóstico na 3ª e 5ª décadas para os papilíferos e na 6ª e 7ª décadas para os foliculares (FIGURA 1).

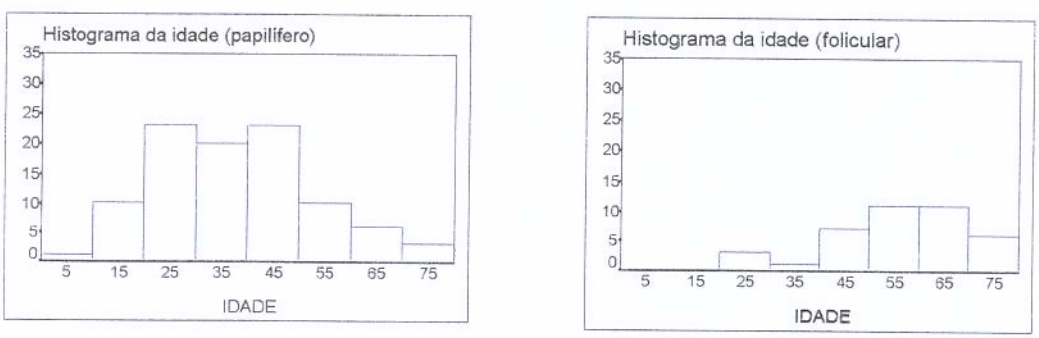


FIGURA 1 – Distribuição da idade ao diagnóstico nos carcinomas papilíferos e foliculares

Para a análise estatística, os pacientes foram divididos segundo a faixa etária, sendo 75 casos (56.3 %) com idade menor ou igual a 45 anos e 60 casos (43.7%) maior que 45 anos.

Na população estudada, 106 pacientes (78.5 %) eram do sexo feminino (F) e 29 (21.5 %) do masculino (M), com uma relação F : M de 3.6 : 1. Quando observamos pelo tipo histológico foi de 3.57 : 1 nos papilíferos e de 3.87 : 1 nos foliculares.

Na nossa casuística 117 (86.7 %) eram brancos e 18 (13.3 %) não brancos.

A queixa clínica, que motivou o diagnóstico, foi: aparecimento de nódulo em 63 (46.7%), aumento de nódulo antigo em 26 (19.3 %), resultado positivo de exame anatomopatológico em 15 (11.1 %), aumento de bócio antigo em 13 (9.6 %), detecção de metástase em 11 (8.1 %) e aparecimento de bócio em 7 (5.2 %).

A medida do tamanho do nódulo foi possível em 121 pacientes e variou entre 0.4 e 11 cm, sendo que em 77 casos (63.6%) eram menor ou igual a 4cm e em 44 (36.4 %) maior que 4 cm.

Verificamos associação significativa entre o tamanho do nódulo e o tipo histológico (p=0.001). Em vista deste resultado avaliamos este dado em separado, para cada tipo histológico. Em 88 pacientes com carcinoma papilífero o tamanho do nódulo variou entre 0.4 e 7 cm (média = 3, DP = 1.6; mediana = 3), e em 33 casos de folicular variou entre 1.5 e 11 cm (média = 5.4, DP = 2.4 e mediana = 5), como pode ser visto na FIGURA 2.

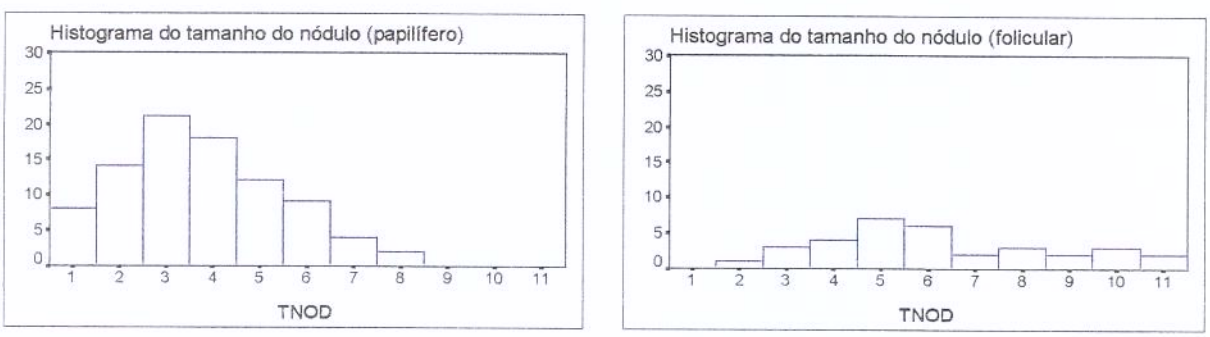


FIGURA 2 – Distribuição do tamanho do nódulo nos carcinomas papilíferos e foliculares

Quando avaliamos o tamanho do nódulo, de acordo com a idade, utilizando a medida contínua, pelo teste de Mann-Whitney, a diferença foi estatisticamente significativa

tanto nos papilíferos como nos foliculares. Nos carcinomas papilíferos, no grupo com idade até 45 anos, a média foi 2.7 e a mediana 2.0 e no grupo maior que 45 anos a média foi 3.6 e a mediana 3.5 (p = 0.0101). Nos foliculares, para o grupo com idade até 45 anos a média foi 3.5 e a mediana 3.3 e no maior que 45 anos a média foi 5.9 e a mediana 5.0 (p =0.0247).

Para verificar se havia diferença estatística do tamanho do nódulo entre o sexo masculino e o feminino utilizamos o teste de Mann-Whitney e verificamos que no folicular a média foi 5.7 cm para mulheres e 4.67 cm para os homens (p = 0.26) e no papilífero foi 2.9 cm para mulheres e 3.3 cm para os homens (p = 0.40), não havendo diferença estatística, portanto, entre os sexos.

Não ocorreu associação significativa entre tamanho do nódulo e metástases ao diagnóstico tanto nos papilíferos (p = 0.225) como nos foliculares (p = 0.724).

Houve associação significativa entre tamanho do nódulo e ocorrência de eventos tardios nos carcinomas papilíferos (p = 0.038) mas não nos foliculares (p = 0.825).

Foi possível definir o grau de diferenciação do tumor em 108 casos, conforme mostra a TABELA 7.

TABELA 7 - Freqüência em 108 casos de acordo com o grau de diferenciação e tipo histológico do tumor

Grau de Diferenciação	Total		Papilífero		Folicular	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Bem diferenciado	66	(61.1)	54	(72)	12	(36.4)
Moderadamente	31	(28.7)	18	(24)	13	(39.4)
Pouco diferenciado	11	(10.2)	3	(4)	8	(24.2)
Total	**108**	(100)	**75**	(100)	**33**	(100)

Notamos que entre os 75 casos de carcinoma papilífero 54 (72%) eram bem diferenciados, 18 (24%) moderadamente diferenciados e 3 (4%) pouco diferenciados. Nos 33 casos de carcinoma folicular 12 (36.4%) eram bem diferenciados, 13 (39.4%) moderadamente diferenciados e 8 (24.2%) pouco diferenciados.

A informação de metástase ao diagnóstico foi possível em 115 casos, sendo que 49 (42.6%) não apresentavam nenhuma metástase, 42 (36.5%) apresentavam apenas em linfonodo regional e em 24 (20.9%) havia metástases a distância, sendo que ocorreu associação significativa entre metástase a distância ao diagnóstico e tipo histológico (p=0.001). Não observamos associação significativa entre metástases em linfonodo (ao diagnóstico) e ocorrência de eventos tardios - ecidiva ou metástases (p = 0.069).

As freqüências da variável metástases a distância ao diagnóstico, para cada tipo histológico, estão sumariadas na TABELA 8.

TABELA 8 - Freqüência das metástases ao diagnóstico de acordo com tipo histológico

Metástases ao Diagnóstico	**TOTAL** n (%)	**Papilífero** n (%)	**Folicular** n (%)
Não apresentaram	49 (42.6)	30 (37)	19 (55.9)
Linfonodo Regional	42 (36.5)	40 (49.4)	2 (5.9)
Metástases a Distância	24 (20.9)	11 (13.6)	13 (38.2)
TOTAL	**115** (100)	**81** (100)	**34** (100)

O local e freqüência das metástases a distância ao diagnóstico, estão listadas no ANEXO 2.

Dos 135 pacientes iniciais, 3 perderam o seguimento após a cirurgia e 132 foram acompanhados por um período que variou entre 6 e 314 meses. Setenta e nove pacientes (59.8%) foram considerados em remissão, pois não ocorreu nenhum evento após a cirurgia.

Em 53 casos (40.2%) foram detectadas metástases a distância ao diagnóstico ou aparecimento mais tardio e destes, 5 (3.8%) apresentaram regressão de metástases com a radiodoterapia, 31 pacientes (23.5%) não apresentaram remissão completa, em 14 (10.6%) houve recidiva local ou detecção de metástases e em 3 (2.3%) ocorreu morte em decorrência do tumor.

A TABELA 9 mostra as freqüências da ocorrência de eventos durante o seguimento.

TABELA 9 - Freqüência da ocorrência de eventos durante o seguimento de acordo com o tipo histológico

Evento	Total		Papilífero		Folicular	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Em remissão	79	(59.8)	64	(67.4)	15	(40.5)
Regressão de metástases	5	(3.8)	5	(5.2)	0	(0)
Sem remissão completa	31	(23.5)	16	(16.8)	15	(40.5)
Recidiva ou metástase	14	(10.6)	10	(10.5)	4	(10.8)
Morte	3	(2.3)	0	(0)	3	(8.1)
TOTAL	**132**	(100)	**95**	(100)	**37**	(100)

Entre os 95 pacientes com carcinoma papilífero, 64 (67.4%) não apresentaram metástases ou recidiva local, 5 (5.3%) tiveram desaparecimento das metástases anteriormente detectadas e concentração sérica de tireoglobulina indetectável, 16 (16.8%) não apresentaram remissão completa das metástases, 10 (10.5%) apresentaram recidiva local ou aparecimento de metástases, sendo que neste grupo não ocorreu nenhum óbito pelo tumor. Entre os 37 pacientes com carcinoma folicular em seguimento, 15 (40.5%) não apresentaram recidiva local ou metástases, 15 (40.5%) que apresentavam metástases não apresentaram remissão completa, 10 (27%) apresentaram recidiva local ou aparecimento de metástases e ocorreram 3 (8.2%) mortes pelo tumor.

Durante o período de seguimento deste estudo, dos 37 casos de carcinoma folicular 22 (59.5%) apresentaram metástases tardias, e dos 95 casos de carcinoma papilífero, 26 (27.3 %).

Houve associação positiva entre a ocorrência de eventos e o tipo histológico (p=0.01).

Os locais e freqüência de metástases a distância tardias, detectadas nos pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide, durante o seguimento estão no ANEXO 3.

Em um subgrupo de 63 casos, cujas características estão detalhadas no ANEXO 4, foram realizadas as reações de imuno-histoquímica para PCNA e proteínas p53 e bcl-2.

Os resultados das reações estão resumidos nas TABELAS 10, 11 e 12.

TABELA 10 – Resultado das reações para PCNA de acordo com o tipo histológico e o grau de diferenciação do tumor

	PCNA +		**PCNA –**		**TOTAL**
	Papilífero	Folicular	Papilífero	Folicular	
Bem Diferenciado	16	5	20	1	42
Moderadamente Diferenciado	1	4	5	5	15
Pouco Diferenciado	0	5	0	1	6
TOTAL	**17**	**14**	**25**	7	**63**
	31 (49.2%)		**32** (50.78%)		**63** (100)

TABELA 11 - Resultado das reações para proteína p53 de acordo com o tipo histológico e o grau de diferenciação do tumor

	p53+		p53–		TOTAL
	Papilífero	Folicular	Papilífero	Folicular	
Bem Diferenciado	5	2	31	4	42
Moderadamente Diferenciado	0	1	6	8	15
Pouco Diferenciado	0	2	0	4	6
TOTAL	**5**	**5**	**37**	**16**	**63**
	10 (15.9%)		**53** (84.1%)		**63**(100%)

TABELA 12 - Resultado das reações para bcl-2 de acordo com o tipo histológico e o grau de diferenciação do tumor

	Bcl-2+		Bcl-2–		TOTAL
	Papilífero	Folicular	Papilífero	Folicular	
Bem Diferenciado	26	5	10	1	42
Moderadamente Diferenciado	4	9	2	0	15
Pouco Diferenciado	0	5	0	1	6
TOTAL	**30**	**19**	**12**	**2**	**63**
	49 (77.8%)		**14** (22.2%)		**63**(100%)

Não encontramos associação positiva entre metástases ao diagnóstico e PCNA (p=0.556, p = 0.494); p53 (p = 0.223, p = 0.149); bcl-2 (p = 0.889, p = 1.0), tanto nos papilíferos quanto nos foliculares, respectvamente.

Não observamos associação positiva entre ocorrência de eventos e PCNA (p=0.466, p = 0.485); p53 (p = 1.0, p = 0.214); bcl-2 (p = 1.0, p = 1.0), tanto nos papilíferos quanto nos foliculares, respectvamente.

Foram realizados o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher para verificar a existência de associação entre as variáveis: idade, sexo, cor, tamanho do nódulo, metástases

ao diagnóstico, ocorrência de eventos, PCNA, p53 e bcl-2 com o tipo histológico e o grau de diferenciação.

Os resultados estão resumidos na TABELA 13

TABELA 13 - Resultados das associações segundo o teste Qui-Quadrado ou exato de Fisher

Variáveis	p-valor
Idade X Tipo Histológico	pQ = 0.001
Idade X Grau de Diferenciação	pQ = 0.007
Sexo X Tipo Histológico	pQ = 0.361
Sexo X Grau de Diferenciação	pQ = 0.841
Cor X Tipo Histológico	pQ = 0.004
Cor X Grau de Diferenciação	pF= 0.032
Tamanho do nódulo X Tipo Histológico	pQ = 0.001
Tamanho do nódulo X Grau de Diferenciação	pQ = 0.028
Metastase ao diagnóstico X Tipo Histológico	pQ = 0.001
Metastase ao diagnóstico X Grau de Diferenciação	pF= 0.0002
Evento X Tipo Histológico	pF = 0.001
Evento X Grau de Diferenciação	pF = 0.001
PCNA X Tipo Histológico	pQ = 0.046
PCNA X Grau de Diferenciação	pQ = 0.072
p53 X Tipo Histológico	pF = 0.280
p53 X Grau de Diferenciação	pF = 1.00
bcl-2 X Tipo Histológico	pF = 0.114
bcl-2 X Grau de Diferenciação	pF = 0.350

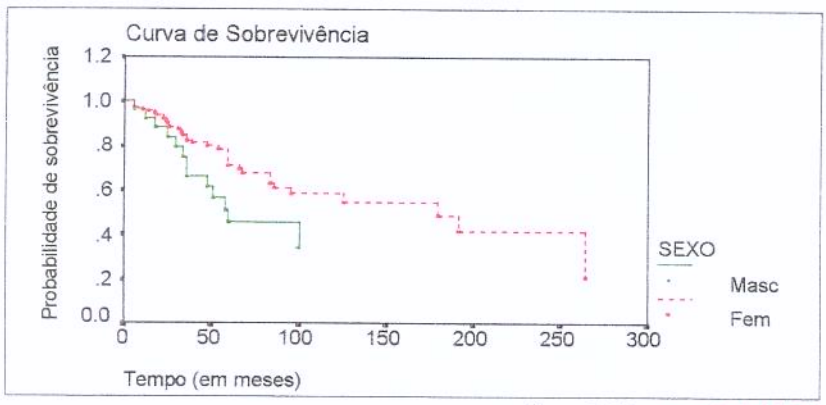
Foram realizados o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher para verificar a existência de associação entre as variáveis: idade, sexo, cor, tamanho do nódulo, PCNA, p53 e bcl-2 dos pacientes em estudo e do grupo controle.

Os resultados estão sumariados na TABELA 14.

TABELA 14 - Resultados das associações segundo o teste Qui-Quadrado ou exato de Fisher entre pacientes e grupo controle

Variáveis	**p-valor**
Idade	pQ = 0.947
Sexo	pF = 0.170
Cor	pF = 0.443
Tamanho do nódulo	pQ = 0.407
PCNA	pQ = 0.774
p53	pF = 0.195
bcl-2	pF = 0.025

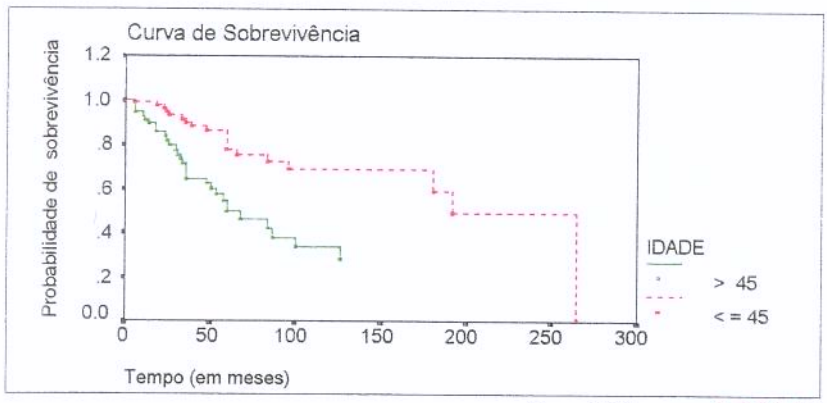
Foram realizadas curvas de sobrevida para as variáveis sexo, idade, cor, tamanho do nódulo, tipo histológico, grau de diferenciação, PCNA, p53 e bcl-2, que estão mostradas nas FIGURAS 3 a 10.



(n = 132 ; p = 0.0457)

FIGURA 3 - Curva de sobrevida para 105 pacientes do sexo feminino (--) e 27 pacientes do sexo masculino (--).

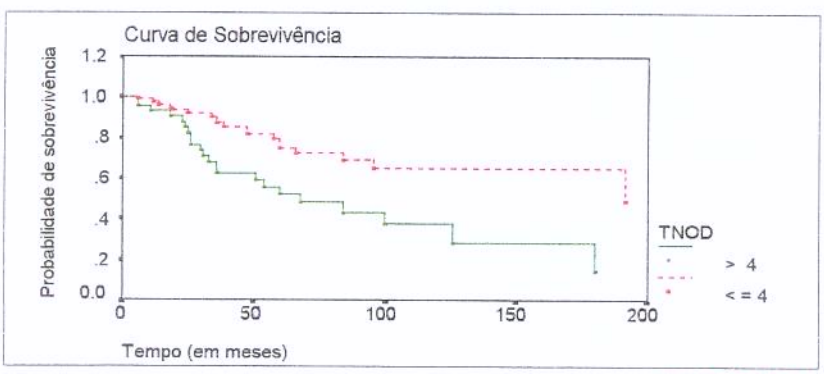
Podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos do sexo feminino e do masculino diferem entre si.



(n = 132 ; p = 0.0004)

FIGURA 4 - Curva de sobrevida para 75 pacientes com idade ≤ 45 anos (--) e 57 com idade > 45 anos (--)

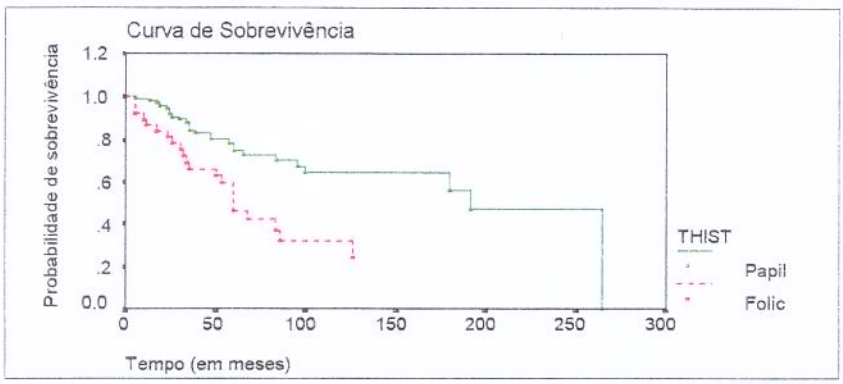
Podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos com idade ≤ 45 anos e > 45 anos diferem entre si.



(n = 119 ; p = 0.0022)

FIGURA 5 - Curva de sobrevida para 77 pacientes com tamanho do nódulo ≤ 4 cm (--) e 42 com tamanho do nódulo >4 cm (--)

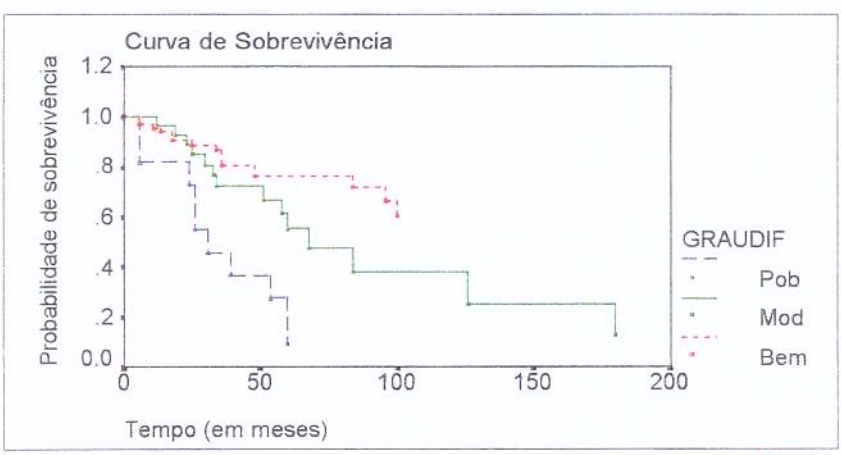
Podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos com tamanho do nódulo menor ou igual a 4 cm e maior que 4 cm diferem entre si.



(n = 132 ; p = 0.0014)

FIGURA 6 - Curva de sobrevida para 37 pacientes com o tipo histológico folicular (--) e 95 pacientes com o tipo histológico papilífero (--)

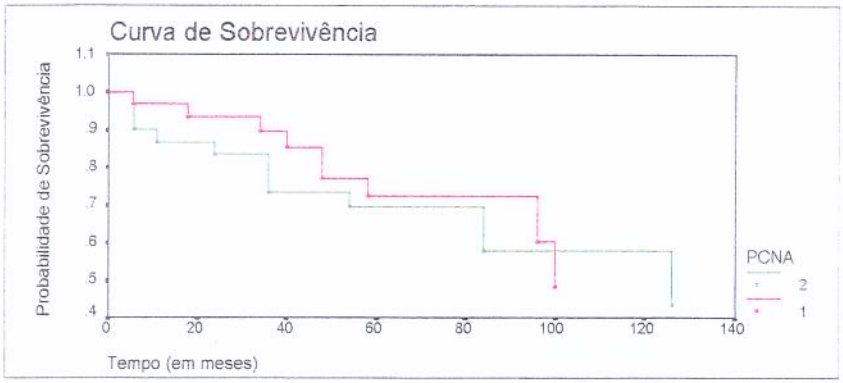
Podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos com o tipo histológico folicular e papilífero diferem entre si.



(n = 105 ; p = 0.001)

FIGURA 7 - Curva de Sobrevida de acordo com o grau de diferenciação: 65 pacientes bem diferenciado (--), 29 pacientes moderadamente diferenciado (--) e 11 pacientes pouco diferenciado (--).

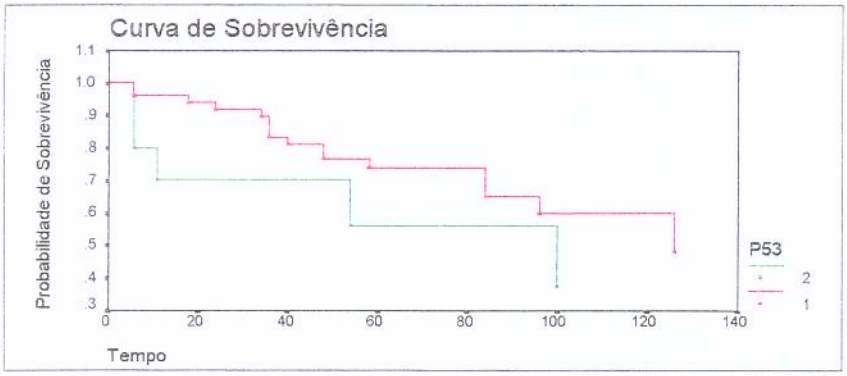
Pela significância do teste (p = 0.001) podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos com carcinoma bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado diferem entre si.



(n = 60 ; p = 0.6963)

FIGURA 8 - Curva de sobrevida para 30 pacientes com classificação PCNA negativo (--) e 30 pacientes com classificação PCNA positivo (--)

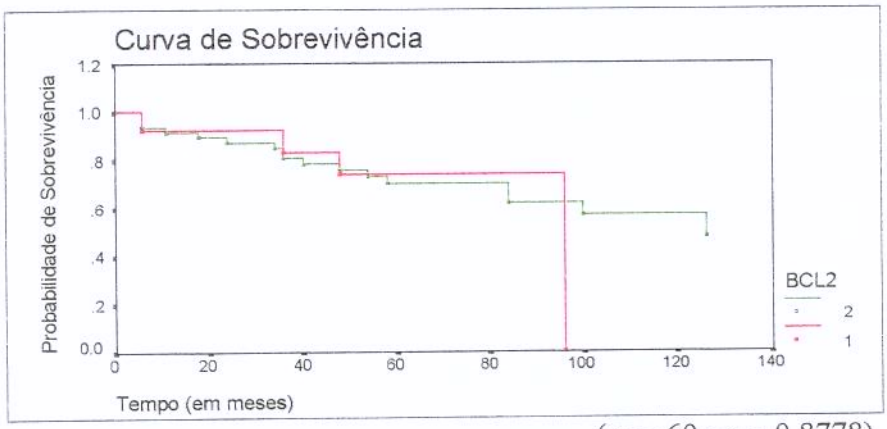
Podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos com PCNA negativo e PCNA positivo não diferem entre si.



(n = 60 ; p = 0.2801)

FIGURA 9 - Curva de sobrevida para 50 pacientes com classificação p53 negativo (--) e 10 pacientes com classificação p53 positivo (--)

Podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos com classificação p53 negativo e p53 positivo não diferem entre si.



(n = 60 ; p = 0.8778)

FIGURA 10 - Curva de sobrevida para 13 pacientes com classificação bcl-2 negativo (--) e 47 pacientes com classificação bcl-2 positivo (--).

Podemos afirmar que as curvas de sobrevida dos grupos com bcl-2 negativo e bcl-2 positivo não diferem entre si.

O resumo dos resultados das comparações entre as curvas de sobrevida estão listados na TABELA 15.

TABELA 15 - Resultados das comparações entre as curvas de sobrevida

Variáveis	**p-valor (log-Rank)**
Sexo	p = 0.0457
Cor	p = 0.1984
Idade	p = 0.0004
Tamanho do Nódulo	p = 0.0022
Tipo Histológico	p = 0.0014
Grau de Diferenciação	p = 0.001
PCNA	p = 0.6963
p53	p = 0.2801
bcl-2	p = 0.8778

Foi realizada Regressão de Cox para Análise Univariada cujos resultados estão na TABELA 16.

TABELA 16 - Resultado da Regressão de Cox para Análise Univariada

Variável	p-valor
Idade	0.0007
Sexo	0.0517
Cor	0.2075
Tamanho do Nódulo	0.0032
Tipo Histológico	0.0022
Grau de Diferenciação	0.0027

Foi realizada análise de Regressão de Cox para Análise Multivariada utilizando *stepwise* para o procedimento de seleção das variáveis, sumariadas na TABELA 17.

TABELA 17 - Resultado Final da Regressão de Cox para Análise Multivariada

Variável	Parâmetro	S.E.	CHISQ	p-valor	Risco	IC (95%)
SEXO	0.680205	0.34693	3.84411	0.0499	1.9474	(1.000; 3.897)
IDADE	0.857227	0.36873	5.40536	0.0201	2.357	(1.144; 4.855)
GRAUDIF	0.825411	0.35615	5.37119	0.0205	2.283	(1.136; 4.588)

Pelos resultados apresentados observa-se que:

- Para os pacientes do sexo masculino o risco de ocorrer um dos eventos (*Sem remissão completa, Metástase, Recidiva ou Morte*) é 1.9474 vezes maior do que para os pacientes do sexo feminino.

- Para os pacientes com idade >45anos o risco de ocorrer um dos eventos (*Sem remissão completa, Metástase, Recidiva ou Morte*) é 2.357 vezes maior do que para os pacientes com idade ≤ 45 anos.

- Para os pacientes com grau de diferenciação moderado ou pouco diferenciado o risco de ocorrer um dos eventos (*Sem remissão completa, Metástase, Recidiva ou Morte*) é 2.283 vezes maior do que para os pacientes com grau bem diferenciado.

DISCUSSÃO

Embora o carcinoma da tireóide seja considerado um tumor raro, que em geral causa poucas mortes, quando acompanhamos um grande número de pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide o que nos chama a atenção é a diferença de comportamento entre os casos, durante a evolução.

Existem controvérsias quanto ao tipo de cirurgia e seguimento, mas na população que estudamos todos os pacientes foram submetidos a tireoidectomia total seguida de dose de ^{131}Iodo, quando havia restos de glândula no leito da tireóide, e reposição de hormônio tireoideano (T4) em doses supressivas para o TSH (YOUNG *et al.*, 1980).

Na literatura observa-se que alguns autores não fazem distinção entre carcinoma papilífero e folicular enquanto que outros ressaltam a importância do tipo histológico (TUBIANA *et al.*, 1985; GILLILAND *et al.*, 1997; SHAH *et al.*, 1992, SIMPSON *et al.* 1987).

Segundo DONOHUE *et al.* (1984), e confirmado por MAZZAFERRI & JHIANG (1994a), os fatores idade, sexo e estágio do tumor são mais importantes no prognóstico do paciente do que a classificação histopatológica de papilífero ou folicular (bem diferenciados).

Por outro lado, o carcinoma folicular tem mortalidade mais alta do que o carcinoma papilífero em pacientes mais velhos e em estágio mais avançado da doença, fato também observado por CADY *et al.* (1979). THORESEN *et al.* (1989) mostraram que a sobrevida não difere em pacientes com carcinoma papilífero e folicular com idade e estágio do tumor semelhantes ao diagnóstico. Ao contrário, GILLILAND *et al.* (1997) encontraram diferença na sobrevida de pacientes com carcinoma folicular e papilífero, mesmo quando pareados de acordo com a idade e estágio ao diagnóstico, enfatizando que os pacientes com carcinoma folicular têm sobrevida menor do que os portadores de carcinoma papilífero. GREBE &

HAY (1995) compararam as curvas de sobrevida de pacientes com carcinoma papilífero e folicular e mostraram que existe diferença entre eles, como também reportado por LOH *et al.* (1997). Em 1995, DeGROOT *et al.*, ressaltaram que a média de idade ao diagnóstico é maior no folicular e que a morte pelo tumor ocorre mais cedo e é 2 vezes maior nesses pacientes, entretanto o número de recorrências é maior no papilífero.

Em nossa casuística a média de idade ao diagnóstico foi maior no carcinoma folicular e houve associação positiva do tipo histológico com as seguintes variáveis: idade ao diagnóstico, cor, tamanho do nódulo, grau de diferenciação, metástases ao diagnóstico, PCNA e ocorrência de eventos, mostrando que existe um comportamento tumoral diferente dependendo do tipo histológico.

A idade ao diagnóstico é, sem dúvida, o mais importante fator prognóstico independente para todos os carcinomas diferenciados da tireóide. O risco de recorrência e de morte aumentam linearmente com a idade, segundo: CARCANGIU *et al.* (1985) após os 40 anos; SIMPSOM *et al.* (1987) após os 45anos; SHAH *et al.* (1992) após os 50 anos; MAZZAFERRI & JHIANG (1994) após os 60 anos e SALVESEN *et al.* (1992) após os 70 anos.

A literatura mostra que por ocasião do diagnóstico os pacientes com carcinoma papilífero têm idade entre 30 e 50 anos e que o carcinoma folicular incide em pessoas mais idosas, geralmente com mais de 50 anos. DeGROOT *et al.* (1990, 1995) descreveram picos de incidência na 3ª e 4ª décadas para os carcinomas papilíferos e na 4ª e 6ª para o carcinoma folicular. GREBE & HAY (1995), descrevem pico na 6ª década para os carcinomas foliculares.. HÖLZER *et al.* (2000) encontraram pico na 6ª década para os papilíferos e na 7ª e 8ª para os foliculares. Observamos, em nosso material, a existência de picos na 3ª e 5ª décadas para o papilífero e na 6ª e 7ª décadas para o carcinoma folicular. Verificamos que houve influência da variável idade ao diagnóstico na curva de sobrevida, concordando com os achados de CADY *et al.* (1979) e HAY *et al.* (1990). Na população em estudo a média de idade ao diagnóstico foi maior nos carcinomas foliculares e houve

associação positiva entre idade e tipo histológico. Notamos também que os nódulos foram significativamente maiores no grupo com idade maior que 45 anos independente do tipo histológico.

Encontramos na literatura referência a pior prognóstico para o sexo masculino. Entretanto, alguns autores acreditam que esta diferença não esteja diretamente relacionada ao sexo, mas à média de idade mais elevada para os homens. Na população estudada esta diferença não ocorreu: tivemos para o carcinoma papilífero a média de idade de 37.4 anos para mulheres e 37.4 anos para homens e no carcinoma folicular a média de 54.7 anos para as mulheres e 58 anos para os homens. Estudamos também a associação das variáveis tamanho do nódulo e sexo, em cada tipo histológico, e não encontramos diferença significativa. Entretanto, encontramos influência da variável sexo na curva de sobrevida, fato também descrito por BYAR *et al.* (1979), DeGROOT *et al.* (1990,1995) SALVENSEN *et al.* (1992), LOH *et al.* (1997). Quando fizemos a análise em separado pelo tipo histológico, esta influência não foi evidente, mostrando apenas uma tendência nos tumores papilíferos.

Segundo MAZZAFERRI & JHIANG (1994) existe uma relação linear entre tamanho do nódulo e recorrência e entre tamanho de nódulo e mortalidade específica pelo tumor, tanto para os carcinomas papilíferos quanto para os foliculares. Na população em estudo houve correlação entre tamanho do nódulo e tipo histológico, apresentando os carcinomas foliculares maior tamanho. Estudamos a variável tamanho do nódulo para verificar se havia diferença entre o sexo masculino e o feminino e não encontramos diferença significativa. Estudando o tamanho do nódulo (de modo contínuo) de acordo com a faixa etária, observamos que tanto no papilífero quanto no folicular os nódulos eram maiores nos grupos com idade acima de 45 anos. Da mesma forma, tamanho do nódulo e sexo em cada tipo histológico não mostraram diferença significativa. Quando avaliamos a influência do tamanho do nódulo na curva de sobrevida, notamos que existe interferência desta variável sobre a mesma.

Na população estudada observou-se associação entre o grau de diferenciação do tumor e o tamanho do nódulo, porém, quando analisamos este dado em separado para cada tipo histológico não encontramos diferença significativa. Encontramos associação entre o grau de diferenciação e metástases ao diagnóstico, que permaneceu positiva tanto no papilífero como no folicular quando analisados em separado. Observamos associação positiva entre o grau de diferenciação e a ocorrência de eventos. Quando analisamos os pacientes separados pelo tipo histológico, a associação foi positiva no grupo de carcinoma papilífero mas não no de folicular. O grau de diferenciação foi significativo na curva de sobrevida, seu valor foi significativo na análise univariada e representou fator de risco na análise multivariada.

As metástases para linfonodos são freqüentes no carcinoma papilífero, principalmente nos pacientes na faixa etária abaixo de 17 anos, mas pouco freqüentes no carcinoma folicular (LARSEN, DAVIES, HAY, 1998). O valor prognóstico é bastante controverso, (TUBIANA *et al.*,1985; AKSLEN *et al.* 1991; MAZZAFERRI & JHIANG, 1994a; DeGROOT *et al.* 1990; HAY 1990, 1993. Em 1996, GREBE & HAY comentam que fica difícil concluir sobre a importância da presença de metástases para linfonodos ao diagnóstico no carcinoma folicular devido à sua raridade. Na população em estudo 49.4% e 5.9% dos pacientes com carcinoma papilífero e folicular, respectivamente, apresentavam metástases em linfonodos cervicais ao diagnóstico. Não foi observada associação entre presença de linfonodo e a ocorrência de recidiva ou metástases.

As metástases a distância estão relacionadas com a morte causada pelo tumor. Porém, diferente do que ocorre em outros canceres, elas são compatíveis com sobrevida bastante longa (SHAH *et al.*, 1992). MAZZAFERRI & JHIANG (1994) estudaram 1 355 pacientes com carcinoma papilífero e folicular durante um longo período e mostraram que nos pacientes que não apresentavam metástases a distancia ao diagnóstico a morte em decorrência do tumor aconteceu em 6% dos papilíferos e 15% dos foliculares em 30 anos. LARSEN, DAVIES, HAY (1998) mostraram que a presença de metástases a distancia ao

diagnóstico nos pacientes com carcinoma papilífero ou folicular sempre indica pior prognóstico. Nestes pacientes a mortalidade causada pelo tumor varia de 36 a 47% em 5 anos, podendo chegar a 70% em 15 anos. LOH *et al.* (1997) estudaram pacientes que não apresentaram metástases ao diagnóstico e desenvolveram recorrência. Mostraram que, quando elas ocorrem, são detectadas com maior freqüência nos primeiros 5 anos. Em aproximadamente 15% do casos as metástases podem ser detectadas 10 anos após o tratamento inicial, e em alguns raros casos até 30 anos depois, justificando a necessidade de seguimento durante toda a vida (SCHLUMBERGER & PACINI, 1999).

Encontramos associação entre a presença de metástases ao diagnóstico e o tipo histológico. Estavam presentes em 13.6% dos papilíferos e em 38.2% dos foliculares. Observamos também associação positiva entre metástases ao diagnóstico e o grau de diferenciação do tumor, ,tanto no folicular como no papilífero quando analisados separadamente.

Encontramos associação positiva entre a ocorrência de eventos e o tipo histológico e também entre a ocorrência de eventos e o grau de diferenciação. Quando avaliamos o grau de diferenciação em separado para cada tipo histológico, a associação foi positiva para o papilífero mas não para o folicular.

Quanto aos eventos tardios, nos foliculares não obtivemos desaparecimento de metástases com radiodo e tivemos 8.1% de morte pelo tumor. Nos papilíferos encontramos maior porcentagem de desaparecimento de metástases após terapêutica com ^{131}I e menor porcentagem de recidivas.

Os estudos de SHIMIZU *et al.* (1993), utilizando técnica de IHQ, avaliaram a expressão do PCNA nos tumores da tireóide e mostraram maior porcentagem de núcleos positivos nos carcinomas mais agressivos, sugerindo que este resultado pudesse estar relacionado com o comportamento clínico do tumor. Os estudos publicados posteriormente não foram muito animadores quanto ao emprego do PCNA como fator preditivo de

agressividade do tumor nos carcinomas diferenciados. LEITE *et al.* (1999) estudaram em pacientes com carcinoma papilífero a expressão do PCNA. Avaliaram separadamente cada um dos parâmetros utilizados no sistema M.A.C.I.S de *score* prognóstico (M = presença de metástases; A = idade; C = tipo de cirurgia; I = invasão local; S = tamanho do tumor) e não encontraram diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. SILVA FILHO *et al.* (1999) encontraram correlação entre a porcentagem de positividade para o PCNA e idade (> 40 anos) em pacientes com carcinoma papilífero.

Nos 63 casos estudados, foi observada expressão do PCNA em quase metade dos casos (49,2%). A maior porcentagem encontrada (85.9%) correspondia a um caso de carcinoma folicular pouco diferenciado. Quando comparamos a expressão do PCNA deste subgrupo e do grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa.

A expressão do PCNA não mostrou influência na curva de sobrevida.

A imuno-expressão da proteína p53 foi positiva em apenas 10 casos (15.9%) sendo 5 papilíferos (11.9%) e 5 foliculares (23.8%). A maior porcentagem de positividade encontrada (88.5%) corresponde a uma senhora de 70 anos, com carcinoma folicular pouco diferenciado, com várias metástases ao diagnóstico, mas não foi observada porcentagem mais elevada nos demais casos de carcinoma com menor diferenciação histológica, contrariando os achados de DONGHI *et al.* (1993), ITO *et al.* (1992), FAGIN *et al.* (1993), PILOTTI *et al.* (1993), DOBASHI *et al.* (1993), MATIAS-GUIU *et al.* (1996). Não encontramos associação significativa entre p53 e outras variáveis. Quando comparamos a expressão da proteína p53 deste subgrupo e do grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa. A expressão da proteína p53 não mostrou interferência na curva de sobrevida.

Em nosso material, o bcl-2, marcador de apoptose celular, mostrou-se positivo em 49 casos (77.8%), sendo 26 papilíferos bem diferenciados (61.9%) e 4 menos diferenciados (9.5%); 5 foliculares bem diferenciados (23.8%) e 14 menos diferenciados (66.7%),

constituindo 73.8% dos tumores bem diferenciados e 85.7% dos menos diferenciados. Nossos resultados foram concordantes com os obtidos por POLLINA *et al.* (1996) e BASSOLO *et al.* (1997) que encontraram porcentagem semelhante para os carcinomas bem diferenciados, mas discordantes para os tumores menos diferenciados, nos quais foi constatada 100% de positividade.

Quando comparamos a expressão da proteína bcl-2 do grupo com carcinoma diferenciado da tireóide com os controles, verificamos que existe diferença estatisticamente significativa, porém não ocorreu influência da expressão da proteína bcl-2 na curva de sobrevida.

BASSOLO *et al.* (1997) também não observaram correlação significativa da expressão do bcl-2 quando avaliaram: idade, sexo, estágio TNM e sobrevida.

O estudo imuno-histoquímico feito em subgrupo de nossa casuística não conseguiu demonstrar nenhuma alteração particularmente importante no prognóstico da neoplasia de tireóide. Foram feitas diversas associações entre variáveis, sem significância estatística. Os numerosos estudos em patologia molecular encontrados na literatura voltam-se principalmente à interpretação do comportamento biológico dos tumores e não para a sua utilização em fatores prognósticos.

Concluímos que os marcadores imuno-histoquímicos estudados não mostraram relação com o prognóstico dos carcinomas diferenciados da tireóide, neoplasias onde os fatores anteriormente estabelecidos são os mais importantes.

CONCLUSÕES

- Para os pacientes do sexo masculino o risco de ocorrência de eventos (*remissão incompleta, metástase, recidiva ou morte*) foi 1.9474 vezes maior do que para as pacientes do sexo feminino.

- Para os pacientes com idade maior que 45 anos o risco de ocorrência de eventos (*remissão incompleta, metástase, recidiva ou morte*) foi 2.357 vezes maior do que para os pacientes com idade igual ou menor que 45 anos.

- Para os pacientes com grau de diferenciação moderado ou pouco diferenciado o risco de ocorrência de eventos (*remissão incompleta, metástase, recidiva ou morte*) foi 2.283 vezes maior do que para os pacientes com grau bem diferenciado.

- Os marcadores imuno-histoquímicos utilizados não foram relevantes para a avaliação do prognóstico.

- Os fatores que interferiram no prognóstico foram: idade ao diagnóstico, sexo, tamanho do nódulo, tipo histológico e o grau de diferenciação do tumor.

SUMMARY

The data of 135 patients with thyroid differentiated carcinoma, from the Hospital das Clínicas da UNICAMP, Endocrinology Service, were analysed in order to characterize this population, to observe the frequence of clinical and anatomopathologic features and their association with the prognosis.

The literature reports the interference of proto-oncogenes and tumor supressor genes in the evolution of several neoplasias. We studied the PCNA expression as well as the p53 and bcl-2 proteins, in some patients of our casuistry, in order to verify their possible significance in the clinical evolution. The immunohistochemical studies were made according to the technique of HSU *et al* (1981), modified. The statistical analysis included: the tests Fisher exact, qui square and Mann-Whitnney tests, and survival curves of Kaplan-Meier and Log Rank. Univariate and multivariate analysis were used too.

Our results showed: the thyroid carcinomas were follicular in 28.9% and papillary in 71.1%; 78.5% were female and 21.5% were male; the age at diagnosis ranged from 9 to 76 years (mean=42.5; SD=17.1; median=43). Divided according to the histologic type, the 96 cases of papillary carcinoma were: 75 (78.1%) female and 21 (21.9%) male; 87 (90.6%) white and 9 (9.4%) not white; 68 (70.8%) $\leq$ 45 years of age and 28 (29.2%) older than 45; the age at diagnosis ranged from 9 to 75 years (mean=33.3; SD= 15.4 median=35.5), as to the follicular carcinomas we observed: 31 (79.5%) female and 8 (20.5%) male; 30 (76.9%) white and 9 (23.1%) not white; 8 (20.5%) $\leq$ 45 years of age and 31 (79.5%) older than 45; the age at diagnosis ranged from 20 to 76 years (mean=55.4; SD=14.3; median=58).

The tumor size ranged from 0.4 to 11cm: in the papillary tumors from 0.4 to 7cm (mean=3; SD=1.6; median=3) and in the follicular tumors ranged from 1.5 to 11cm (mean=5.5; SD=2.4; median=5).

We found significatant associations between: age and histologic type, age and differentiation degree, tumor size and histologic type and between tumor size and differentiation degree.

We found positive associations between: the presence of distant metastases at the time of diagnosis and follicular type and differention degree. In addition, there was also association between occurrence of events (metastases regression, incomplete remission, recurrence or metastases and death) and follicular type, as well as with differentiation degree.

Comparing the survival curves (Log Rank) we see the influence of the variables: age, nodule size, histologic type, differentiation degree.

Using the univariate analysis, the variables age, tumor size, histologic type and differentiation degree can better explain the occurrence of events.

On the order hand, multivariate analysis showed that sex, age and differentiation degree were the more important factors, when we study the occurrence of events.

In 63 patients from our population, 42 papillary carcinomas and 21 follicular carcinomas, we evaluated the PCNA expression, as well as the p53 and bcl-2 proteins, searching correlation with the prognosis.

We concluded that the markers we sudied do not influence the prognosis of the differentiated thyroid carcinoma and that in these neoplasias the factors previously established (age, nodule size, histologic type, differentiation type) are still the most important.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIN, K.B.- Papillary thyroid carcinoma: etiology, assessment, and therapy. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am., 24**(4):711-760, 1995.

AKSLEN, L.A.; HALDORSEN, T.;THORESEN,S.O.;GLATTRE,E. - Survival and causes of death in thyroid cancer: a population-based study of 2479 cases from Norway. **Cancer Res. 51:**1234-1241, 1991

BARGONETTI, J.; MANFREDI, J.J.; CHEN, X.; MARSHAK, D.R.; PRIVES, C. - A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence specific DNA-binding activity when generated from wilde-type but not from oncogenic mutant p53 protein . **Genes Dev.,** 7:2565-2574, 1993.

BASSOLO, F.; POLLINA, L.; FONTANINI, G.; FIORE, L.; PACINI, F.; BALDANZI, A. - Appoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. **Br. J. Cancer, 75**(4):537-41, 1997.

BATTIFORA, H. - p53 immunohistochemistry: a word of caution. **Hum. Pathol., 25**:435-437, 1994. [Editorial]

BEAHRS O.H, HENSON DE, HUTTER RVP, MYERS M H. - Manual for staging of Cancer: American Joint Committee on Cancer .:4 th ed.: Philadelphia: JB Lippincott: 1992.

BISHOP, J.M. - The molecular genetics of cancer. **Science, 235**:305-311, 1987.

BORING, C.C.; SQUIRES, T.S.; TONG, T. - Cancer statistics, 1993. **CA Cancer J. Clin., 43**:7-26, 1993.

BRAVO, R.& CELIS, J.E.: - A search for differential polypeptide syntesis throughout the cell cycle of HeLa cells. **J. Cell Biol., 84**:795-802, 1980.

BRONNER ,M.P.; CULLIN, C. REED, J.C.; FURTH, E.E. - The bcl-2 proto-Oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. **Am. J. Pathol., 146**:20-26,1995.

BYAR, D.P.; GREEN, S.B.; DOR, P.; WILLIAMS, D.; COLON, J.; GILSE, H.A.; MAYER, M.; SYLVESTER, R.J.; GLABBEKE, M.V. – A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. thyroid cancer cooperatve group. **Eur. J. Cancer, 15**:1033-1041, 1979.

CADY, B.- Comparative analysis of thyroid carcinoma in Germany and the U.S. **Cancer, 89**:1-4, 2000. [Commentary]

CADY, B.; SEDGWICK, C.E.; MEISSNER, W.A.; BOOKWALTER, J.R.; ROMAGOSA, V.; WERBER, J. – Changing clinical, pathhologic, therapeutic and survival patterns in differentiated thyroid carcinoma. **Ann. Surg., 185**: 541-553, 1976.

CADY, B.; SEDGWICK, C.E.; MEISSNER, W.A.; WOOL, M.S.; SALZMAN, F.A.; WERBER, J.- Risk factor analysis in differentiated thyroid cancer. **Cancer, 43**:810-820, 1979.

CADY, B.; ROSSI, R.; SILVERMAN, M.; WOOL, M.- Further evidence of the validity of risk group definition in differntiated thyroid carcinoma. **Surgery, 98**: 1171-1178, 1985.

CADY, B.& ROSSI, R. - An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. **Surgery, 104**:947-953, 1988.

CARCANGIU, M.L.; ZAMPI, G.; PUPI, A.; CASTAGNOLI, A.; ROSAI, J. - Papillary carcinoma of the thyroid: A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. **Cancer, 55**:805- 828, 1985

CARR, K.; HEFFESS, C.; JIN, L.; LLOYD, R.V. - Immunohistochemical analysis of thyroid carcinomas utilizing antibodies to p53 and Ki-67. **Appl, Immunohistochem., 1**(3);201 -207, 1993.

CELIS, J.E.; BRAVO, R.; LARSEN, P.M.; FEY, S.J. - Cyclin: a nuclear protein whose level correlates directy with the proliferative state of nornal as wel as transformed cells. **Leuk. Res., 8**:143-157, 1984.

COLLETT, D. –**Modelling Survival Data in Medical Reserch**. London: Chapman & Hall.1994. 321p.

COLOMBEL, M.; SYMMANS, F.; GIL, S.; O'TOOLE, K.M.; CHOPIN, D.; BENSON, M.; OLSSON, C.A.; KORSMEYER, S.; BUTTYAN, R. - Detection of the apoptosis-supressing oncoprotein bcl-2 in hormone refractory human prostate cancers . **Am. J. Pathol., 143:**390-400, 1993.

CONOVER, W.J. – **Pratical Nonparametric Statistics**: New York: John Wiley & Sons, INC: 1971; 462p.

CZYZ, W.; JOENSUU, H.; PYLKKÄNEN, L.; KLEMI, P.J. - P53 protein, PCNA staining and DNA content in follicular neoplasms of the thyroid gland. **J. Pathol., 174** (4):267-274, 1994.

DeGROOT, L.J.; KAPLAN, E.L.; MCCORMICK, M.; STRAUS, F.H. - Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab., 71**:414-424, 1990.

DeGROOT, L.J.; KAPLAN, E.L.; SHUKLA, M.S.; SALTI, G.; STRAUS, F.H Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab., 80**:2946 –2953, 1995.

DOBASHI, Y.; SAKAMOTO, A.; SUGIMURA, H.; MERNYEI, M.; MORI, M.; OYAMA, T.; MACHINAMI, R. - Overexpression of p53 as a possible factor in humam thyroid carcinoma. **Am. J. Surg. Pathol., 17**(4):375-381, 1993.

DOBASHI, Y; SUGIMURA, H; SAKAMOTO, A; MERNYEI, M; MORI, M; OYAMA, T; MACHINAMI, R. - Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentation of human thyroid carcinomas. **Diagn. Mol. Patol., 3**(1): 9-14, 1994.

DONGHI, R.; LANGONI, A.; PILOTTI, S.; MICHIELI, P.; DELLA PORTA, G.; PIEROTTI, M.A. - Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. **J. Clin. Invest., 91**: 1753-1760 , 1993.

DONOHUE, J.H.; GOLDFIEN, S.D.; MILLER, T.R.; ABELE,J.S.; CLARK, O.H. – Do the prognoses of papillary and follicular thyroid carcinomas differ? **Am. J. Surg., 148**:168-173, 1984.

DULGEROFF, A.J.; HERSHMAN, J.M. - Medical therapy for differetiated thyroid carcinoma. **Endocr. Rev., 15** (4):500-515, 1994.

FAGIN, J.A.; MATSUO, K.; KARMAKAR, A.; CHEN, D.L.; TANG, S-H.; KOEFFLER, H.P .-High prevalence of mutation of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. **J. Clin. Invest., 91**(1):179-184, 1993.

FARID N.R.; SHI, Y.; ZOU, M. - Molecular basis of thyroid cancer. - **Endocr Rev, 15**(2):202-232, 1994.

FARID, N.R.; ZOU, M.; SHI, Y. - Genetics of follicular thyroid cancer. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am., 24**(4):865-883, 1995.

FLEISS, J.L. – **Statistical Methods for Rates and Proportions**. New York. John Wiley & Sons, Inc, 2nd ed. 1981: 321p.

FONTANINI, G.; VIGNATI, S.; BIGINI, D.; MUSSI, A.; LUCCHI, M.; ANGELETTI, C.A.; BASSOLO, F.; BEVILACQUA, G. - Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer.**Br J Cancer, 71**:1003-1007, 1995.

GILLILAND, F.D.; HUNT, W.C.; MORRIS, D.M.; KEY, C.R.- Prognostic factors for thyroid carcinoma: A population-based study of 15.698 cases from surveillance, epidemiology and end results (SEER) program 1973-1991. **Cancer,79**:564-573, 1997.

GREBE, S.K.G.& HAY, I.D.- Follicular thyroid cancer. **Endocrinol. Clin. Metab. North. Am., 24**(4):761-801, 1995.

GREBE, S.K.G.& HAY. I.D.- Thyroid cancer nodal metatastases: biologic significance and terapeutic considerations. **Surg. Oncol. Clin. N. Amer., 5**: 43-46, 1996.

HALL, P.A. & LANE, D.P. - p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry ?- Revisited!. **J. Pathol., 172**:1-4, 1994. [Editorial]

HARRIS, C.C.& HOLLSTEIN, M. - Clinical implications of the p53 tumor-supressor gene. **N. Engl. J. Med., 329**:1318-1327, 1993.

HAY, I.D. - Papillary thyroid carcinoma. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 19**: 545-576, 1990.

HAY, I.D.; BERGSTRALH, E.J.; GOELLNER, J.R.; EBERSOLD, J.R.; GRANT, C.S.; - Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: Development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 pacients sugically treated at one institution during 1940 through 1989. **Surgery, 114**:1050-1058, 1993.

HEDINGER, C.; WILLIAMS, E.D.; SABIM, L.H. - The WHO histological classification of thyroid tumors: a comentary on the second edition. **Cancer, 63**: 908-911, 1989.

HEROD, J.J.; ELIOPOULOS, A.G.; WARWICK, J.; NIEDOBITEK, G.; YOUNG, L.S.; KERR, D.J. - The prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. **Cancer Res., 56**:2178-2184, 1996

HO, Y.-S. ; TSENG, S.C. ; CHIN, T.Y.; HSIEH, L.L.; LIN, J.D. - p53 gene mutation in thyroid carcinoma. **Cancer Letters ,103 (1):**57-63, 1996.

HOCKENBERY, D.M.; ZUTTER, M.; HICHEY, W.; NAHAN, M.KORSEMEYER, S.I. - Bcl-protein is topografically restricted in tissue characterized by apoptotic cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88**:6961- 6965, 1991.

HOCKENBERY, D.M. - Bcl-2, a novel regulator of cell death. **Bioessays, 17**: 631-638, 1995

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS. C.C. - p53 mutation in human cancers. **Science, 253**:49-52, 1991.

HÖLLZER, S.; REINERS, C.; MANN, K.; BAMBERG, M.; ROTHMUND, M.; DUDECK, J.; STEWART, A.K.; HUNDAHL, S.; for the U.S. and German thyroid cancer group - Patterns of care for patients with primary differentiated carcinoma of the thyroid gland trated in Germany during 1996. **Cancer, 89**: 192-201, 2000.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H.A. – A comparative study of the peroxidase-antiperoxidasemethod amd na avidin-biotin complex method for studyng polypeptide hormones with radioimmuno-assay anti bodies. **Am. J. Clin. Pathol., 75**:734-738, 1981.

HUNDAHL, S.; CADY, B.; CUNNINGHAM, M.P.; MAZZAFERRI, E.; McKee, R.F.; ROSAI, J.; SHAH, J.P.; FREMGEN, A.M.; STEWART, A.K.; HÖLLZER, S. for the U.S. and German thyroid cancer group - Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma trated in United States during 1996 : an Americam College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation Study. **Cancer, 89**: 202-217, 2000.

ITO, T.; SEYAMA, T.; MIZUNO, T.; TSUYAMA, N.; HAYASHI, T.; HAYASHI, Y.; DOHI, K. ;NAKAMURA, N.; AKIYAMA, M. - Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinoma of the thyroid gland .**Cancer Res., 52**:1369-1371, 1992.

ITO, T.; SEYAMA, T.; MIZUNO, T.; TSUYAMA, N.;.; HAYASHI, Y.; DOHI, K.; NAKAMURA, N.; AKIYAMA, M.:- Genetic alterations in thyroid tumor progression: Association with p53 gene mutations. **Jpn. J. Cancer Res., 84**: 526-531, may 1993.

JOSSART, G.H.; EPSTEIN, H.D.; SHAVER, J.K.; WEIER, H-U.; GREULICH, K.M.; TEZELMAN, S.; GROSSMAN,R.F.; SIPERSTEIN,A.E.; DUH, Q,Y.CLARK, O.H.: - Immunocytochemical detection of p53in human thyroid carcinomas is associated with mutation and immortalization of cell lines. **J. Clin Endocrinol. Metab., 81**:3498-3504, 1996

KAPLAN, L.E.& MEIER,P. - Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Am. Stat. Assoc., 53**:457-481, 1958.

KORSMEYER, S.J. - Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **Blood, 80** (4) :879-886, 1992.

LARSEN, R.P.; DAVIES, T.F.; HAY, I.D.- The thyroid Gland. **In**: WILSON, JD.; FOSTER, D.W.; KRONENBERG, H.M.; LARSEN, P.R. **Williams Textbook of Endocrinology** 9th ed. Philadelphia. W.B. Saunders Company. 1998: 398-515.

LANE, D.P.& CRAWFORD, L.V. - T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cell. **Nature, 278**:261-263, 1979.

LANE, D.P. - p53 and human cancers. **Br. Med. Bull., 50**:582-599, 1994.

LEE, S-H.& HURWITZ, J. - Mechanisn of elongation of primed DNA by DNA polymerase δ, proliferating cell nuclear antigen, and activador 1. **Proc. Nat. Acad. Sci USA, 87**:5672-5676, 1990.

LEITE, K.R.M.; ARAUJO, V.C.; MEIRELLES, M.I.R.; COSTA, A.L.L.; CAMARA-LOPES, L.H. – No relations between proliferative activity and the macis prognostic scoring system in papillary thyroid carcinoma. **Head Neck, 21**: 602-605, 1999.

LEVINE, A J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A:- The p53 tumor supressor gene **Nature 351**:453-456, 1991.

LEVINE, A.J.; PERRY, M.E.; SILVER, C.A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. - The 1993 Walter Hubert lecture: The role of the p53 tumour- suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer , 69**:409-416, 1994.

LINDEN, M.D.; NATHANSON, S.D.; ZARBO, R.J.- Evaluation of anti-p53 antibody staining: quality control and technical consideration.. **Appl. Immunohistochem., 2**(3):218-224,1994.

LINDEN, M.D.; NATHANSON, S.D.; ZARBO, R.J.- Evaluation of anti-p53 antibody staining immunoreactivity in benign tumors and non neoplastic tissues. **Appl. Immunohistochem., 3**(4):232-238,1995.

LiVOLSI, V.A. – **Surgical pathology of the thyroid.** Philadelphia: W.B. Saunders. 1990, 421 p.

LOH, K-C.; GREENSPAN, F.S.; GEE, L.; MILLER, T.R.; YEO, P.P.B.- Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: A retrospective analysis of 700 patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab., 82**:3553-3562, 1997.

McBRIDE, O.W.; MERRY, D.; GIVOL, D. - The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromossome 17 short arm (17p13). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83**:130-134, 1986.

MATIAS-GUIU, X.; VILLANUEVA, A; CUATRECASAS, M; CAPELLA, G; LEIVA, A; PRAT, J. - p53 in a thyroid follicular carcinoma with foci of poorly differentiated and anaplastic carcinoma. **Path. Res. Pract., 192**:1242-1249, 1996.

MAZZAFERRI, E.L - Carcinoma of Follicular Epitelium: Radiodine and others Treatments and Outcomes. In: WERNER and INGBAR'S **The Thyroid: A fundamental and Clinical Text**, 7th ed. BRAVERMAN, L.E.; UTIGER,R.D (Eds), Philadelphia. Lippincott-Raven.1996: 922-945.

MAZZAFERRI, E.L.& JHIANG, S.M. – Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. **Am. J. Med., 97**:418-428, 1994.

MERRY, D.E.; VEIS, D.J. HICKEY, W.F.; KORSMEYER, S.J. - Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. **Development, 120**:301-311, 1994.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M.J.; TAN, E.M. - Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **J. Immunol. 121**:2228-2234, 1978.

NAKAMURA, T.; YANA, I.; KOBAYASHI, T.; SHIN, E.; KARAKAWA, K.; FUJITA, S.; MIYA, A.; MORI, T.; NISHISHO, I.; TAKAI, S. - p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroi carcinomas. **Jpn. J. Cancer Res., 83**:1293-1298, 1992.

NGAN, B-Y.; CHEN-LEVY, Y.; WEISS, L.M.; WARNKE, R.A.; CLEARY, M.L. - Expression in non-Hodgkin´s lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. **N. Engl. J. Med., 318**:1638-1644, 1988.

NIGRO, J.M.; BAKER, S.J.; PREISINGER, A.C.; JESSUP J.M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S.H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILEE, P.; GLOVER. T.; COLLINS, F.S.; WESTON, A.; MODALI, R.; HARRIS, C.C.; VOGELSTEIN, B. – Mutation in p53 gene occur in diverse human tumor types. **Nature, 342**:705-708, 1989.

NISHIDA, T.; NAKAO, K.; HAMAJI, M.; NAKAHARA, M.; TSUJIMOTO, M. - Overexpression of p53 protein and DNA content are important biologic prognostic factors for thyroid cancer. **Surgery 119**:568-575, 1996.

PAPOTTI, M.; BOTTO-MICCA, F.P.; FAVERO, A.; PALESTINI, N.; BUSSOLATI, G. - Poorly differentiated thyroid carcinomas with primordial cell component.: a group of agressive lesions sharing insular , trabecular, and solid patterns. **Am. J. Surg. Pathol.**, **17**(3):291-301, 1993.

PEZZELLA, F.; TSE, A.G.D.; CORDELL, J.L.; PULFORD, K.A.F.; GATTER, K.C.; MASON, D.Y. - Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. **Am. J. Pathol., 137**:225-232, 1990.

PEZZELLA, F.; TURLEY, H.; KUZU, I. - Bcl-2 protein in non-small-cell lung Carcinoma. **N Engl. J. Med.329**:690-694, 1993a

PEZZELLA, F.; MORRISON, H.; JONES, M.; GATTER, K.C.; LANE, D.; HARRIS, A.L; MASON, D.Y. - Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 in non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology 22**:39-44, 1993b

PEZZELLA, F.& GATTER, K.- What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologists? **Histopathology, 26**:89-93, 1995. [Commentary]

PILOTTI, S.; COLLINI, P.; RILKE, F.; CATTORETTI, G.; DEL BO, R.; PIEROTTI, M.A.: - BCL-2 protein expression in carcinomas originating from the follicular epithelium of the thyroid gland. **J. Pathol., 172**(4):337-342, 1994a.

PILOTTI, S.; COLLINI, P.; DEL BO, R.; CATTORETTI, G.; PIEROTTI, MA; RILKE, F. - A novel panel of antibodies that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of thyroid gland. **Am. Surg. Pathol., 18** (10):1054-1064, 1994b

POLLINA, L.; PACINI F; FONTANINI G.; VIGNATI S.; BEVILACQUA G.; BASOLO F. - Bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentationin thyroid carcinomas. **Br. J. Cancer**, **73**(2):139-143, 1996.

REED, J.C.: - Bcl-2 and regulation of programmed cell death. **J. Cell Biol., 124**:1-6, 1994.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ROSAI, J.; CARCANJIU, M.L.; DELELLIS, R.A. eds. Atlas of tumor pathology. **Tumors of the thyroid gland.** Series 3 . fascicle 5.Washington.D.C.: AFIP.1992.

SAKAMOTO, A.; KASAI, N.; SUGANO, H.- Poorly differentiated carcinoma of the thyroid : a clinicopathologic entity for a high-risk group of papillary and follicular carcinomas. **Cancer, 52**:1849-1855, 1983.

SALVESEN, H.; NJOLSTAD, P.R.; AKSLEN, L.A.; ALBREKTSEN, G.; SOREIDE, O.; VARHAUG, J.E. – Papillary thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors including na evaluation of the p-TNM staging system. **Eur.J. Surg., 158**:583-589, 1992.

SCHLUMBERGER. M. & PACINI, F. - Prognostc Factors. In: **Thyroid Tumors** Paris. Ëditions Nucléon. 1999. 85-105p

SHAH, J.P.; LOREE, T.R.; DHARKER, D.; STRONG, E.W.; BEGG, C.; VLAMIS, V. - Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. **Am. J. Surg. 164**:658-661, 1992.

SHIMIZU, T.;USUDA, N.; YAMANDA, T.; SUGENOYA, A.; IIDA,F. - Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunhistochemical studies. **Cancer, 71**:2807-2812, 1993.

SIEGEL, S. – **Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento.** São Paulo: Mc Graw Hill: 1975:350p.

SILVA FILHO, G.B.; MACIEL, R.M.B.; TAKAHASHI, M.H.; ALBERTI, V.N.; CASTRO, I.V.; SALDIVA, P.H.N.; DURAZZO, M.D.; FERRAZ, A.R.- Study of immunohistochemical expression of insulin-like growth factor I and proliferating cell nuclear antigen in thyroid gland papillary carcinoma and its metastasis. **Head & Neck, 21,** 723-727, 1999.

SIMPSON, W.J.; MCKINNEY, S.E.; CARRUTRHERS, J.S.; SUTCLIFFE, S.B.; PANZARELLA, C. - Papillary and follicular thyroid cancer : Prognostic factor in 1578 pacients. **Am. J. Med., 83**:479-488, 1987.

SOARES, P.; CAMESELLE-TEIJEIRO, J.; SOBRINHO-SIMÕES, M - Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. **Histopathology, 24**:205-210, 1994.

SOARES P.& SOBRINHO-SIMÕES, M. - Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies. **Cancer, 73**:2879-2880, 1994.

SOUSSI, T.; CARON DE FROMENTAL, C.; MAY, P. - Strutural aspects of the protein in relation to gene evolution. **Oncogene, 5**:945-952, 1990.

SOUSSI, T.; LEGROS, Y.; LUBIN, R.; ORY, K.; SCHLICHTHOLZ, B.- Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer : a review. **Int. J. Cancer, 57**:1-9, 1994.

TATEYAMA, H; YANG, Y-P; EIMOTO, T; TADA, T; INAGAKI, H; NAKAMURA, T; IWASE, H; KOBAYASHI, S. - Proliferative cell nuclear antigen expression in follicular tumour of the thyroid with special reference to oxyfilic cell lesion. **Virchows Arch., 424**(5):533-7, 1994.

THORESEN, S.O; AKSLEN, L.A; GLATTRE, E.; HALDORSEN, T.; LUND, E.V.; SCHOULTZ, M.. - Survival and prognostic factors in differentiated thyroid Cancer - a multivariate analysis of 1 055 cases. **Br J Cancer , 59**: 231-235, 1989.

TRAVALI, S.; KU, D-H.; RIZZO, M.G.; OTTAVIO, L.; BASERGA, R.; CALABRETTA, B. - Struture of the human gene for the prolierating cell nuclear antigen. **J. Biol. Chem., 264**:7466-7472, 1989.

TUBIANA, M.; SCHLUMBERGER, M.; ROUGIER, P.; LAPLANCHE, A.; BENHAMOU ,E.; GARDET, P.; CAILLOU, B.; TRAVAGLI, J-P.; PARMENTIER, C - Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. **Cancer, 55**:794-804, 1985.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E.; CROCE, C.M. - Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science, 228**:1440-1443, 1985.

VAUX, D.L.; WEISSMAN, I.L.; KIM, S.K. - Prevention of programmed cell death in carnorhabditis elegans by human bcl-2. **Science, 258**:1955-1957, 1992.

WASSEM, N.H.& LANE, D.P. - Monoclonal antibody analysis of the proliferating Cell nuclear antigen (PCNA) . Structural conversation and the detection of a nucleolar form. **J. Cell Sci, 196**:121-129, 1990.

WOOLNER. L.B.; BEAHRS, O.H.; BLACK. B.M.; McCONAHEY, W.M.; KEATING, F.R Jr.- Cassification and prognosis of thyroid carcinoma. **Am J Surg , 102**: 354-387, 1961.

WRIGHT, P.; LEMOINE, N.R.; GORETZKI, P.E.;WYLLIE, F.S.; BOND, J.; HUGHES, C.; RÖHER, H-D; WILLIAMS, E.D.; WYNFORD-THOMAS, D. - Mutation of the p53 gene in a differentiated human thyroid carcinoma cell line , but not in primary thyroid tumours. **Oncogene** , **6**:1693-1697, 1991

WRIGHT, P.; JASSANI, B.; NEWMAN, G.; SCHMID, K.; WYNFORD-THOMAS, D. - P53 immunopositivity is a late event in human thyroid carcinoma development. **J. Pathol., 169**:176 A, 1993.

WYNFORD-THOMAS, D. - p53 in tumor pathology : can we trust immunocytochemistry ? **J. Pathol., 166**:329-30, 1992. [Editorial]

YOUNG, R.L.; MAZZAFERRI, E.L.; RAHE, A.J.; DORFMAN, S.G.: - Pure follicular thyroid carcinoma: Impact of therapy in 214 patients. **J. Nucl. Med. 21**:733-737, 1980.

ZOU, M.; SHI, Y.; FARID, N.R. - p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas **J. Clin. Endocrinol. Metab.,77**:1054-1058, 1993.

ZUTTER, M.; HOCKENBERY, D.; SILVERMAN, G.A.; KORSMEYER, S.J. - Immunolocalization of the bcl-2 protein within hematopoietic neoplams. **Blood, 78**:1062-1068, 1991.

ANEXOS

ANEXO 1

CA DE TIREÓIDE - ENDOCRINOLOGIA

Nome: HC:
Data de Nasc. ___/___/___ Data da 1o Consulta:___/___/___
Cor: Sexo: Masc. ( ) Fem. ( ) Profissão:
Procedência: Idade no Diagnóstico:

MOTIVO DA CONSULTA
( ) Nódulo: (descrever) ( ) Bócio: (descrever)

T3 T4 LT4 TSH AcMc AcTG

Tireopatia na Familia Sim ( ) Não ( )

Radiação no Pescoço Sim ( ) Não ( ) Tabagismo Sim ( ) Não ( )

ULTRASOM: (___/___/___)

CINTILOGRAFIA: (____/____/____)

BAAF, data (__/__/__), no da cito_____
diagnóstico:

CIRURGIA: (___/___/___) UNICAMP: Sim ( ) Não ( )

Congelação:

ANÁTOMO PATOLÓGICO: data ____/____/____ no_____ p T_ N _ M _

Diagnóstico

Tam.Nódulo:

PCI: ____/___/____

Dose Radioiodo:____/____/____

Data								
Tg								
AcTg								
LT4								
TSH								
Dose Med.								

ANEXO 2

TABELA 1 (A2) - Local e a freqüência das metástases ao diagnóstico dos carcinomas diferenciados

LOCAL	N	%
Pulmão	9	37.5%
Pulmão e osso	7	29.1 %
Osso	6	25.0 %
Hepática	1	4.2 %
Mediastino	1	4.2 %
TOTAL	24	100 %

Foi realizada a mesma análise com os pacientes em separado pelo tipo histológico.

TABELA 2 (A2) Local e a freqüência das metástases a distância ao diagnóstico dos carcinomas papilíferos

LOCAL	N	%
Pulmão	6	54.5 %
Pulmão e osso	3	27.3 %
Hepática	1	9.1 %
Mediastino	1	9.1 %
TOTAL	11	100 %

TABELA 3 (A2) Local e freqüência das metástases a distância ao diagnóstico dos carcinomas foliculares

LOCAL	N	%
Osso	6	46.1 %
Osso e pulmão	4	30.8 %
Pulmão	3	23.1 %
TOTAL	13	100 %

ANEXO 3

TABELA 1 (A3) Local e a freqüência das metástases tardias dos carcinomas papilíferos

LOCAL	N	%
Pulmão	7	26,9
Pulmão e osso	4	15,4
Pulmão e Recidiva local	4	15,4
Pulmão e Mediastino	2	7,7
Recidiva Local	5	19,2
Recidiva Local +Linfonodo	1	3,8
Linfonodo	2	7,7
Cérebro+ osso	1	3,8
TOTAL	26	100%

TABELA 2 (A3) - Local e a freqüência das metástases tardias dos carcinomas foliculares

LOCAL	N	%
Pulmão	5	26,3
Pulmão e osso	5	26,3
Osso	4	21,1
Recidiva Local	2	10,5
Recidiva Local + Osso	1	5,3
Recidiva Local +Linfonodo	1	5,3
Recidiva local +Cérebro osso	1	5,3
TOTAL	19	100

ANEXO 4

TABELA 1 (A4) – Distribuição de 63 pacientes com carcinoma de Tireóide de acordo com sexo e cor

	Feminino Branco	Feminino **Não Branco**	**Masculino Branco**	Masculino **Não Branco**	TOTAL
Papilífero	26	2	13	1	42
Folicular	10	7	3	1	21
TOTAL	36 (57.1%)	9 (14.3%)	16 (25.4%)	2 (3.2%)	**63**

TABELA 2 (A4) – Distribuição de 63 pacientes com carcinoma de Tireóide , de acordo com a faixa etária e sexo

	Feminino ≤ 45 a	**Masculino ≤ 45 a**	Feminino **> 45 a**	Masculino **> 45 a**	TOTAL
Papilífero	17	9	11	5	42 (66.7%)
Folicular	3	1	14	3	21 (33.3%)
TOTAL	20 (31,7%)	10 (15,9%)	25 (39,7%)	8 (12,7%)	**63** (100%)

TABELA 3 (A4) – Distribuição de 63 pacientes de acordo com a medida do tecido neoplásico

	≤ 4cm	> 4 cm	TOTAL
Ca Papilífero	33	9	42
Ca Folicular	6	15	21
TOTAL	39 (61,9%)	24 (8,1%)	100%

TABELA 4 (A4) – Distribuição de 63 pacientes de acordo com o grau de diferenciação tumoral

Grau de diferenciação	Papilífero	Folicular	Total
Bem diferenciado	36	6	42 (66,6 %)
Moderadamente	6	9	151 (28,7%)
Pobremente	0	6	6 (9,52 %)
Total	42	21	63 (100%)

ERRATA

Pg 32 linha 15
Onde se lê -SOARES, CAMESELLE-TEIJEIRO, SOBRINHO-SIMÕES (1993) leia-se SOARES, CAMESELLE-TEIJEIRO, SOBRINHO-SIMÕES (**1994**).

Pg 33 linha 1
Acrescentar Referência : DOBASHI *et al.* (1994)

Pg 34 linha 15
Onde se lê -NGAN *et al.* (1993) leia-se NGAN *et al.* (**1988**).

Pg 46 linha 10
Onde se lê - O tempo de seguimento foi considerado em meses após o diagnóstico, leia-se **O tempo de seguimento foi considerado em meses após o diagnóstico e variou entre 6 e 314 meses.**

Pg 73 linha 14
Onde se lê MAZZAFERRI & JHIANG (1994a) leia-se MAZZAFERRI &JHIANG (**1994**).

Pg 76 linha 14
Onde se lê MAZZAFERRI & JHIANG (1994a) leia-se MAZZAFERRI &JHIANG (**1994**).

Pg 93 linha 10
Onde se lê- CELIS, J.E.; BRAVO, R.; LARSEN, P.M.; FEY, S.J. - Cyclin: a nuclear protein whose level correlates directy with the proliferative state of nornal as wel as transformed cells. **Leuk. Res., 8**:143-157, 1984 leia-se **normal.**

Pg 95 linha 18
Onde se lê- GREBE, S.K.G.& HAY, I.D.- Follicular thyroid cancer. **Endocrinol. Clin. Metab. North. Am., 24**(4):761-801, 1995 leia-se **Endocrinol. Metab Clin.. North. Am**

Pg 96 linha 11
Onde se lê- HEDINGER, WILLIAMS, SABIN, (1988) leia-se HEDINGER, WILLIAMS, **SOBIN**, (1988).

Observação

Após a pg 114 estão colocadas 2 Planilhas com os dados de todos os pacientes estudados.