



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MAYANE EMANUELA MELO LOPES MARTINS

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES ESTROGÊNICOS ALFA
E PROGESTERONA NO CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREÓIDE.**

FORTALEZA

2015

MAYANE EMANUELA MELO LOPES MARTINS

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES ESTROGÊNICOS ALFA
E PROGESTERONA NO CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREÓIDE.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Martins (UFC).
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida (UFC).

FORTALEZA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M341a Martins, Mayane Emanuela Melo Lopes.
 Avaliação imunohistoquímica da expressão de receptores estrogênicos alfa e progesterona no carcinoma diferenciado de tireóide / Mayane Emanuela Melo Lopes Martins. – 2015.
 59 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Oncologia.
 Orientação: Prof. Dr. Manoel Martins.
 Coorientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.
1. Receptores de Progesterona. 2. Estrogênios. 3. Neoplasias da Glândula Tireoide. I. Título.

MAYANE EMANUELA MELO LOPES MARTINS

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES ESTROGÊNICOS ALFA
E PROGESTERONA NO CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREÓIDE.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Oncologia

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Dra Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dra Ana Karina de Melo Bezerra Sodré
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Dra. Ana Rosa Pinto Quidute
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Manoel Ricardo Alves Martins
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico esta tese aos meus pais: **Edineide e Álvaro**,
por estarem ao meu lado sempre e independentemente
de qualquer coisa. Por me apoiarem, acreditarem
e se orgulharem de mim.

Ao meu marido: **Roberto**, pela compreensão,
pelo apoio e pelo amor que me dedica diariamente.

Ao meu **filho(a)**, tão desejado,
que em meio a um turbilhão de emoções e tantas atribuições
me faz perceber um amor
tão grande crescendo dentro de mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de todas as coisas.

Ao meu orientador, Dr. Manoel Martins, agradeço por me permitir fazer parte de seu grupo, por sua disponibilidade, pelos ensinamentos e compreensão.

Ao Dr. Paulo Almeida, meu co-orientador, agradeço pelo seu inestimável apoio, pela sua paciência, sabedoria e solicitude. Sem sua participação e ajuda esta tese não seria possível.

Ao Dr. Fernando Shemelzer, meu mestre durante a faculdade e minha mola percussora para realização do mestrado, agradeço pela colaboração e incentivo que sempre me ofereceu.

À Dra. Teresa Neuma, agradeço pela sua disponibilidade, por compartilhar seus conhecimentos e colaborar com o desenvolvimento deste trabalho.

Às servidoras do departamento de patologia, Glícia e Rejane, agradeço pelo tempo que puderam dedicar para buscar meus dados e me ajudarem com o desenvolvimento do trabalho.

À servidora e amiga Valéria Cordeiro, agradeço pela dedicação e ajuda nas horas necessárias.

À servidora Susana Moreira, agradeço pelo seu trabalho criterioso e competente na realização da imunohistoquímica.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Margarida Maria de Lima Pompeu, Prof^a Dra. Ana Karina de Melo Bezerra Sodré, Prof^a. Dra. Dra. Ana Rosa Pinto Quidute, pela aceitação e disponibilidade de participar e contribuir para o melhoramento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do mestrado, em especial Neli e Kélvia que foram apoio nas horas mais difíceis. Agradeço pelos momentos juntas, pelos ensinamentos, diversão, carinho e amizade.

Aos docentes do Mestrado em Patologia, pelos ensinamentos repassados e pela dedicação.

Ao CNPq, pois sem o apoio financeiro, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando.
A certeza de que precisamos continuar.
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.
Portanto devemos fazer da interrupção, um caminho novo.
Da queda, um passo de dança.
Do medo, uma escada.
Do sonho, uma ponte.
Da procura, um encontro”.

Fernando Sabino

RESUMO

Com o uso de métodos sensíveis de imagem, observa-se um aumento nos nódulos tireoidianos diagnosticados. Mesmo o CDT (câncer diferenciado de tireóide) sendo proporcionalmente raro, sua incidência vem aumentando, especialmente de tumores pequenos, cuja evolução clínica é incerta. Observa-se na prática clínica que a maioria dos pacientes com CDT evolui bem quando adequadamente tratada, com índices de mortalidade similares à população geral. Por outro lado, um percentual não desprezível apresenta recidivas e alguns eventualmente não respondem às terapias convencionais, evoluindo para óbito. Percebe-se com isso a necessidade de identificação de marcadores que possam prever o comportamento dos tumores devido, sobretudo, à variabilidade na progressão clínica da doença. Com esses dados, alguns pesquisadores, em busca desses marcadores, estão estudando uma possível relação de fatores hormonais e reprodutivos na evolução do CDT. No presente estudo analisamos a imunexpressão do receptor de estrogênio α (ER α) e receptor de progesterona (PR), correlacionando-a com características clínicas, em 80 pacientes femininos e masculinos com câncer papilífero de tireóide (PDT) e câncer folicular de tireóide (FDT), utilizando material referente a peças de tireoidectomia realizadas no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no período de 2010 a 2014. Observou-se o predomínio de pacientes do sexo feminino (87,5%), com idade superior ou igual a 40 anos (68,57%), média de idade 49,12, tumor com dimensão >1cm (69,04%), tipo histológico papilífero (95,24%), com localização em único lobo, não multicêntrico, (61,90%), ausência de invasão angiolinfática (67,85%), ausência de invasão da cápsula (75%), sem Tireoidite de Hashimoto (73,80%). Em tecidos normais adjacentes observou-se que a expressão de RE (77,77%) é maior que a expressão de RP (47,05%). Em tumores observou-se o contrário, ER α (43,75%) e PR (47,5%) sendo maior a expressão de RP, esses dados foram correlacionados com as características clínicas dos tumores, como: sexo, tamanho do tumor, idade ao diagnóstico, invasão capsular, invasão linfática, tireoidite de Hashimoto, localização do tumor, tipo histológico e variantes.

Palavras-chave: Receptores de progesterona. Receptores de estrogênio. Câncer de tireóide.

ABSTRACT

With the use of sensitive imaging methods, there is an increase in thyroid nodules diagnosed. Even the CDT (differentiated thyroid cancer) being proportionately rare, its incidence is increasing, especially small tumors whose clinical outcome is uncertain. It is observed that in clinical practice most patients with CDT develops well when properly treated, mortality rates similar to the general population. On the other hand, a non-negligible percentage has relapses and some eventually not respond to conventional therapies, and died. It can be seen that with the need to identify markers that can predict the behavior of tumors, mainly due to the variable clinical disease progression. With these data, some researchers in search of these markers, are studying a possible relationship of hormonal and reproductive factors in the evolution of CDT. This study analyzes the immunoreactivity of α estrogen receptor (ER α) and progesterone receptor (PR), correlating it with clinical features in 80 female and male patients with papillary thyroid cancer (PDT) and follicular thyroid cancer (FDT) with materials related to thyroidectomy pieces performed at the University Hospital Walter Cantídio (HUWC) in the period from 2010 to 2014. There was a predominance of female patients (87.5%), older than or equal to 40 years (68.57%), average age 49.12, tumor size > 1 cm (69.04%), papillary histological type (95.24%), with location in one wolf, not multicenter, (61.90 %), lack of angiolymphatic invasion (67.85%), absence of invasion of the capsule (75%) without Hashimoto's thyroiditis (73.80%). In adjacent normal tissues it was observed that ER expression (77.77%) is greater than the PR expression (47.05%). In tumors observed the opposite, ER α (43.75%) and PR (47.5%) with a higher PR expression, these data were correlated with the clinical characteristics of tumors, such as gender, tumor size, age the diagnosis, capsular invasion, lymphatic invasion, Hashimoto's thyroiditis, tumor location, histological type and variants.

Keywords: Progesterone receptors. Estrogen receptors. Thyroid cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem do gráfico da reação do <i>Dako</i> [®] <i>PT Link</i> , para recuperação antigênica.	27
Figura 2.	29
A RE + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 200X;	
B - RE + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 400X;	
C - RP + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 200X;	
D - RE + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 400X	
Figura 3.	31
A- Tecido de câncer diferenciado de tireóide com marcação citoplasmática de RE α 5-25%	
B- Tecido de câncer diferenciado de tireóide marcação nuclear de RE > 25%. (400x)	
Figura 4.	31
A- Tecido de câncer diferenciado de tireóide com marcação nuclear de RP 5-25%.	
B- Tecido de câncer diferenciado de tireóide com marcação nuclear de RP > 25%. (400x)	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos 80 pacientes com câncer diferenciado de tireóide analisados no estudo.	32
Tabela 2. Tipos histológicos dos 84 casos de CDT analisados.	32
Tabela 3. Associação entre a presença de imunexpressão de Receptor Estrogênico (RE+) no tumor e variáveis clínico-patológicas.	33
Tabela 4. Associação entre a presença de imunexpressão de Receptor de Progesterona (Rp+) no tumor e variáveis clínico-patológicas.	34
Tabela 5. Expressão de RE em tumores de pacientes dos sexos feminino e masculino.	35
Tabela 6. Expressão de RE em tumores de pacientes <40 anos >40anos	35
Tabela 7. Expressão de RE em tumores <1cm (microcarcinomas) e >1cm	35
Tabela 8. Expressão de RP em carcinoma diferenciado de tireoide do tipo papilífero e folicular.	36
Tabela 9. Expressão de RE em pacientes com CDT variantes clássicas e não clássicas.	36
Tabela 10. Expressão de RE em tumores de tireoide quanto a localização, multicêntricos e não multicêntricos.	37
Tabela 11. Expressão de RE em tumores com invasão linfática e sem invasão linfática.	37
Tabela 12. Expressão de RE em tumores com invasão capsular e sem invasão capsular	37
Tabela 13. Expressão de RE em pacientes com CDT com Tireoidite de Hashimoto e sem Tireoidite de Hashimoto.	38
Tabela 14. Expressão de RE em tumores de pacientes dos sexos feminino e masculino.	38
Tabela 15. Expressão de RP em carcinoma diferenciado de tireoide do tipo papilífero e folicular.	39
Tabela 16. Expressão de RP em tumores de pacientes <40 anos >40anos	39
Tabela 17. Expressão de RP em tumores <1cm (microcarcinomas) e >1cm	39
Tabela 18. Expressão de RP em pacientes com Tireoidite de Hashimoto e sem Tireoidite de Hashimoto.	40
Tabela 19. Expressão de RP em pacientes com CDT variantes clássicas e não clássicas.	40
Tabela 20. Expressão de RP em tumores de tireoide quanto a localização, multicêntricos e não multicêntricos.	41
Tabela 21. . Expressão de RP em tumores de tireoide com invasão linfática e sem invasão linfática.	41
Tabela 22. Expressão de RP em tumores com invasão capsular e sem invasão capsular	41
Tabela 23. Relação entre a expressão de RE e RP em carcinoma diferenciado de tireóide.	42
Tabela 24. Expressão de RE e RP em tecidos normais.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDT	CÂNCER DIFERENCIADO DE TIREOIDE
CPT	CÂNCER PAPILÍFERO DE TIREOIDE
CFT	CÂNCER FOLICULAR DE TIREOIDE
INCA	INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER
PAAF	PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA
IHC	IMUNOHISTOQUÍMICA
HE	HEMATOXILINA EOSINA
TMA	TISSUE MIROAWAY
UFC	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HUWC	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
RE	RECEPTORES DE ESTRÓGENO
RP	RECEPTORES DE PROGESTERONA
CNPQ	CONSELHO NACIONAL DE PESQUISAS
INCA	INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Câncer de tireóide – Aspectos Clínicos.....	13
1.2	Aspectos Epidemiológicos	13
1.3	Fatores de risco.....	15
1.4	Classificação.....	16
1.5	Diagnóstico.....	17
1.6	Tratamento.....	18
1.7	Dificuldades no manejo do paciente.....	20
1.8	Receptores de estrógeno e progesterona X Câncer de tireóide.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Casos e material utilizado.....	24
3.2	<i>Tissue microarray</i>	24
3.3	Imunohistoquímica.....	25
3.4	Escores	28
3.5	Controles.....	28
3.6	Avaliação dos resultados.....	29
3.7	Análise estatística.....	29
3.8	Aprovação no comitê de ética e pesquisa com seres humanos.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Imunomarcção e Variáveis Clínico-Patológicas.....	31
4.2	Distribuição da imunoexpressão de RE em células tumorais.....	35
4.3	Distribuição da imunoexpressão de RP em células tumorais.....	38
4.4	Distribuição da imunoexpressão de RE e RP em células do tecido normal adjacente.....	41
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
7	ANEXOS.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Tireóide – Aspectos Clínicos

A tireóide é uma pequena glândula situada na região cervical anterior, responsável pela produção de dois hormônios, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do ser humano e pela manutenção do equilíbrio metabólico do organismo adulto (MARCELLO et al, 2011).

A glândula da tireóide é frequentemente local de formação de nódulos, sendo estas formas de apresentação de várias doenças desta glândula. O câncer de tireóide apresenta-se geralmente como um nódulo na região cervical; porém, menos do que 5% dos nódulos de tireóide são cânceres e a maior dificuldade do médico é afastar uma neoplasia num nódulo, uma vez que as lesões benignas são a grande maioria das lesões nodulares da tireóide (MACIEL et al, 1998).

Habitualmente a descoberta do nódulo é acidental, pelo médico ou pelo próprio paciente ou sua família; mais raramente, o doente é visto pela primeira vez em virtude da presença de metástases no pescoço, pulmão ou ossos. Mas através do exame físico, o médico consegue detectar sinais semiológicos que sugerem malignidade, que são: fixação do nódulo às estruturas subjacentes (traquéia e músculos), falta de mobilidade do mesmo à deglutição e extensão da doença aos linfonodos cervicais; alguns consideram a consistência endurecida, ou até pétreia do nódulo, como sinal importante de malignidade, porém, muitas vezes, esta consistência é devida à calcificação de cistos benignos (MACIEL, 1998).

Apesar de a maioria dos nódulos tireoidianos serem benignos, é necessário excluir a malignidade, que em mais de 80% dos casos corresponde ao carcinoma bem diferenciado. (ROSÁRIO et al., 2013). Uma vez que o Câncer Diferenciado da Tireóide (CDT) é a neoplasia endócrina mais comum e suas taxas de incidência vem crescendo pelo mundo. (MARCELLO, 2011).

1.2 – Aspectos epidemiológicos

Um nódulo de tireóide palpável pode ser diagnosticado em 4 a 7% da população adulta. (COELI et al., 2005). Se utilizarmos um instrumento muito mais sensível do que as nossas mãos, como a ultrassonografia (US), ou a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e outros métodos de imagem, a prevalência do nódulo da tireóide atinge cerca de metade da população podendo chegar a mais de 80% dos idosos (MARCELLO, 2011).

Apesar de comuns, apenas 5% do total de nódulos é maligno (COELI et al., 2005). Dados nacionais sugerem que a incidência atual do câncer de tireóide não ultrapassa 24 casos por 100.000 habitantes, mas essa taxa vem aumentando nos últimos anos, já sendo a quarta neoplasia maligna mais frequente nas mulheres brasileiras. E esse incremento se deve principalmente ao aumento dos diagnósticos de pequenos carcinomas papilíferos (ROSÁRIO et al., 2013).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) o câncer de tireóide é o câncer mais comum da região da cabeça e pescoço e três vezes mais frequente no sexo feminino. No entanto, o CDT tem aumentado em diferentes regiões do mundo nas últimas décadas, sendo estimado pelo INCA que o câncer de tireóide tenha sido responsável por 12.9% de todas as neoplasias registradas no sexo feminino e por 3.2% das neoplasias do sexo masculino em 2009 (INCA, 2009). Registros nacionais de câncer e publicações brasileiras confirmam o aumento na incidência do CDT, particularmente entre as mulheres, embora a mortalidade pelo CDT esteja diminuindo (CORDIOLI et al, 2009).

Além disso, a prevalência do câncer de tireóide apresenta grande variação geográfica, que pode ser justificado por se estar diagnosticando mais casos de tumores pequenos, muitas vezes microcarcinomas que talvez nunca evoluíssem para tumores clinicamente detectáveis, fato que contribui para a elevada incidência e baixa mortalidade do CDT (MARCELLO, 2011). A grande variedade na incidência em diversos estados do país também pode estar contribuindo para este aumento de prevalência que deve estar relacionada à disponibilidade de recursos de cuidados médicos nas diferentes regiões, à ingestão de iodo na alimentação e à qualidade dos dados dos registros de câncer (COELI et al., 2005).

O projeto GLOBOCAN estimou para o ano de 2002 taxa de incidência de câncer de tireóide ajustada para idade no sexo feminino de 5,5/100.000 nas regiões desenvolvidas (como América do Norte e Europa) e de 2,6/100.000 nas regiões menos desenvolvidas (como África e América do Sul), com taxas de mortalidade, respectivamente, de 0,5/100.000 nas regiões mais desenvolvidas e de 0,8/100.000 nas regiões menos desenvolvidas. Para homens as estimativas foram, respectivamente, de 2,1/100.000 e de 1,0/100.000. A estimativa da taxa de mortalidade na população masculina foi a mesma nas duas regiões, sendo igual a 0,4/1000.000 (WHO & YARC, 2000). No Brasil, os dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) e os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) apontam para um perfil de incidência e mortalidade do câncer de tireóide no Brasil compatível com o descrito na literatura mundial. (COELI et al., 2005).

1.3 Fatores de risco

Alguns parâmetros clínicos de maior suspeita de malignidade em nódulos tireoidianos incluem: idade, sexo masculino, a exposição à radiação na região da cabeça e pescoço, a história pessoal de bócio e nódulo tireoidiano, nódulos de crescimento rápido, nódulos endurecidos, diâmetro >4cm e a história familiar de câncer de tireóide (HORN-ROSS et al, 2001). O perfil genético para a herança de genes codificadores de uma série de enzimas de detoxificação também é fator de predisposição ao câncer diferenciado da tireóide (MARCELLO,2011)

Outros fatores de exposição, tais como a consumo de iodo, o tabagismo, o consumo de álcool e drogas, fatores étnicos e geográficos, além da história menstrual e reprodutiva, têm sido investigados, porém as evidências sobre a sua importância na determinação do câncer tireoidiano são menos consistentes (HORN-ROSS et al, 2001; PRESTON-MARTIN et al, 2003).

A prevalência de nódulos tireoidianos varia de acordo com o método de rastreamento utilizado, passando de cerca de 1% nos homens e 5% das mulheres que vivem em condições de suficiência de iodo, quando o diagnóstico é apenas clínico, para 76% quando se utilizam métodos de imagem como a ultrassonografia. No entanto, em regiões onde a ingestão de iodo é baixa, a prevalência pode ser ainda mais elevada. (FURLANETTO et al, 2000).

Além disso, o carcinoma pode estar relacionado com outras doenças, como o Diabetes Mellitus tipo 2, que é considerado um grupo de distúrbios metabólicos do metabolismo de carboidratos, e a obesidade, que consiste em um aumento de peso, acompanhada do aumento da porção LDL (lipoproteína de baixa densidade) do colesterol, além do aumento da glicose no sangue. Essas doenças podem estar relacionadas às inúmeras mudanças no estilo de vida, caracterizadas por uma vida agitada, com um consumo calórico excessivo e uma redução na atividade física, além de considerar-se ainda a predisposição genética para o excesso de peso (STEEMBURGO et al, 2009)

Características ultrassonográficas podem auxiliar na avaliação do risco de malignidade em nódulos tireoidianos. Consideram-se suspeitos aqueles hipoecogênicos, sólidos ou mistos com componente sólido, mal delimitados, sem halo e com aumento do fluxo nodular central visto pela ultrassonografia com Doppler (PAPINI et al, 2002; MAIA et al, 2007). No entanto, não é possível diferenciar com certeza lesões malignas de benignas somente pela ultrassonografia (US). A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) com estudo citológico do

material obtido permanece até o momento como a técnica “gold-standart” na avaliação de nódulos tireoidianos (COOPER et al, 2006; PACINI et al, 2006).

Apesar de não existirem estudos tão sistemáticos dos fatores prognósticos no CDT, a maioria dos autores considera que a idade é o mais importante aspecto, com evolução muito melhor aqueles pacientes cuja moléstia se iniciou abaixo dos 40 anos. O outro fator importante é a invasividade do tumor, pois aqueles com alto grau de invasão dos vasos e da cápsula têm pior prognóstico. Finalmente, a presença de metástases ao diagnóstico está também associada a uma pior evolução (HORN-ROSS et al, 2001; PACINI et al, 2006).

1.4 Classificação

Os carcinomas da tireóide, de acordo com o tipo histológico, são classificados em diferenciados (papilífero e folicular), não diferenciados (anaplásico) e medulares (COELI et al., 2005). Os carcinomas de tiróide são raros e apresentam quadros clínicos extremamente variáveis, desde aqueles com crescimento muito lento e compatíveis com a expectativa de vida normal, até aqueles com péssima evolução e que levam ao óbito em períodos de semanas ou meses (MACIEL, 1998).

Os carcinomas diferenciados representam 90% dos casos de doença maligna da tireóide, sendo os carcinomas papilíferos os mais freqüentemente observados, seguidos pelos foliculares (WARD et al, 2008). Exceto pelos carcinomas anaplásicos, que apresentam alta letalidade, o prognóstico é geralmente bom, pois se os carcinomas forem diagnosticados cedo, os mesmos, que podem ocorrer em qualquer idade, na maioria das vezes entre 30 e 40 anos de idade, são curáveis (DEGROOT et al, 1990). Estima-se uma sobrevivência global de 95% para carcinomas papilíferos, de 77% em 10 anos para carcinomas foliculares e de 85% em 10 anos para os carcinomas medulares com linfonodos negativos, porém de apenas 40% para aqueles que apresentam invasão ganglionar (COELI et al., 2005).

O câncer de tireóide apresenta como origem 3 tipos diferentes de células, as foliculares, as para-foliculares e as de origem não-tiroidiana. As foliculares, que constituem a quase totalidade dos elementos celulares da tiróide. Os tumores deste tipo mostram diferenciação histológica bastante evidente entre os carcinomas bem diferenciados e os indiferenciados. Os diferenciados, que são a maioria absoluta dos derivados das células foliculares (mais de 90%), são subdivididos em dois grupos, os papilíferos e os foliculares. Os indiferenciados ou anaplásicos constituem apenas 5% dos carcinomas tiroidianos, têm um prognóstico ruim,

evoluindo geralmente para morte em consequência de doença incontrolável no pescoço, com invasão de estruturas vitais, ocorre frequentemente pouco tempo após o diagnóstico. As células para-foliculares, produtoras de calcitonina, são responsáveis por cerca de 5% dos carcinomas tireoidianos, os medulares, que pode ocorrer nas formas familiar ou esporádica, a forma esporádica quase sempre é unilateral, e sem outras manifestações endócrinas, já a forma familiar frequentemente é bilateral, e pode estar associada a outros tumores malignos e benignos do sistema endócrino, situação referida como Síndrome da Neoplasia Endócrina Múltipla (MEN, tipo II). As células de origem não-tireoidiana causam diversos tumores malignos da tireóide, que não ultrapassam a taxa de 5% do total. Entre eles se destacam os linfomas da tireóide, os cárcino-sarcomas, as lesões metastáticas, os teratomas e os hemangioendoteliomas (HEDINGER et al, 1989).

1.5 Diagnóstico

Diante de um paciente com nódulo tireoidiano, anamnese e exame físico detalhados devem ser obtidos (ROSÁRIO et al, 2013). Como a presença de nódulos tireoidianos é a principal manifestação clínica de uma série de doenças tireoidianas, incluindo doenças autoimunes e o nódulo autônomo tóxico, a investigação do nódulo deve sempre incluir a função tireoidiana. Uma vez que a avaliação clínica nem sempre é sensível ou específica para detectar uma disfunção tireoidiana, principalmente no idoso. (MARCELLO, 2011).

Nódulos grandes ou suspeitos na ultrassonografia (US) deverão ser submetidos à punção aspirativa com agulha fina (PAAF), independentemente da história clínica. No entanto, nódulos pequenos e não suspeitos na US somente são investigados em indivíduos com alto risco clínico para malignidade (ROSÁRIO et al, 2013). Indivíduos com história pessoal ou familiar de câncer de tireoide, passado de exposição à radiação na infância ou adolescência, ou nódulo incidentalmente detectado no FDG-PET (captação focal), são considerados de alto risco para malignidade tireoidiana.

O TSH (hormônio estimulante da tireóide) sérico deve ser solicitado na avaliação inicial do nódulo tireoidiano, principalmente para excluir a possibilidade de ele ser autônomo ou hipercaptante, se as concentrações de TSH estiverem elevadas, a dosagem dos anticorpos antitireoperoxidase (anti-TPO) pode ser solicitada para confirmar a tireoidite autoimune.

Recomenda-se também a dosagem sérica de calcitonina para detecção precoce do carcinoma medular de tireoide (CMT) esporádico (ROSÁRIO et al, 2013).

Quanto aos exames de imagem auxiliares ao diagnóstico recomenda-se que ultrassonografia cervical deverá ser realizada em todo paciente com nódulo tireoidiano e a cintilografia tireoidiana que está indicada na suspeita de nódulo funcionante (TSH subnormal) ou quando a citologia é sugestiva de neoplasia folicular. No entanto, não é possível diferenciar com certeza lesões malignas de benignas somente pela ultrassonografia. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) com estudo citológico do material obtido permanece até o momento como a técnica “gold-standart” na avaliação de nódulos tireoidianos (COOPER et al, 2006; PACINI et al, 2006).

Por isso, atualmente o PAAF é o melhor método disponível para distinguir lesões benignas e malignas (HEGEDUS, 2004). Além disso, é um procedimento ambulatorial relativamente fácil, de custo não elevado, e praticamente sem risco de complicações sérias. Porém, é importante que quem realiza este procedimento deve ter experiência assim como o citopatologista que analisa o material aspirado. Quanto à indicação de PAAF, deve-se excluir nódulo hipercaptante ou puramente cístico e considerar a história clínica, o tamanho do nódulo e os achados ultrassonográficos. Os laudos citopatológicos de tireóide são classificados pelo Sistema Bethesda (I Amostra não diagnosticada; II Benigno; III Atípias/Lesão folicular de significado indeterminado; IV Suspeito para neoplasia folicular ou neoplasia folicular; V Suspeito para malignidade; VI Maligno) (ROSÁRIO et al., 2013).

1.6 Tratamento

A cirurgia é recomendada se a citologia for suspeita para malignidade (categoria V de Bethesda) ou maligna (categoria VI de Bethesda). A tireoidectomia total é o procedimento cirúrgico de escolha nos pacientes com diagnóstico pré-operatório de carcinoma papilífero, ou seja, é recomendada: quando a doença nodular é bilateral; está associada à radiação; a citologia é suspeita para malignidade; ou indeterminada e o nódulo > 4 cm ou ≤ 4 cm com alta suspeita clínica ou ultrassonográfica de câncer. No entanto, pacientes com baixa expectativa de vida por uma doença grave associada podem ser poupados desse procedimento, reservando a esses indivíduos terapias paliativas em caso de doença avançada ou progressiva. Da mesma forma, quando a realização da cirurgia for de maior risco pela condição atual do paciente, mas houver perspectiva de reversibilidade desta, a tireoidectomia pode ser adiada por alguns meses se o tumor não estiver avançando ou apresentando crescimento. Isso também se aplica

a mulheres com diagnóstico no início da gestação, que podem ser apenas acompanhadas com US, podendo a cirurgia ser indicada no segundo trimestre, caso haja crescimento tumoral; ou após o parto, se o tumor permanece estável. Não havendo contraindicação, pacientes que não serão operados ou aguardarão a cirurgia por alguns meses deveriam ser mantidos com TSH diminuído ($< 0,5$ mUI/L). (ROSÁRIO et al., 2013).

Lobectomia é considerada suficiente em pacientes com carcinoma papilífero clássico, unifocal, ≤ 1 cm, esporádico, sem acometimento linfonodal ou invasão extratireoidiana aparentes, ou seja, com citologia indeterminada e baixa suspeita clínica e ultrassonográfica de malignidade ou citologia insatisfatória (ROSÁRIO et al., 2013).

Após diagnóstico e procedimento cirúrgico, a ablação/terapia com I 131 está indicada nos pacientes com ressecção tumoral incompleta ou metástases aparentes após a tireoidectomia e que não são candidatos a reintervenção cirúrgica. Já em pacientes submetidos à tireoidectomia total a ablação/terapia com I131 está indicada em pacientes com conhecida persistência tumoral ou com alto ou intermediário risco de recidiva; nos indivíduos de baixo risco, a ablação deve ser dispensada naqueles que apresentarem Tg estimulada ≤ 1 ng/ml após a cirurgia. Em indivíduos de muito baixo risco, sem indicação de I131, a reposição de L-T4 deve ser iniciada imediatamente no pós-operatório (ROSÁRIO et al., 2013).

A maioria dos pacientes com CDT evolui bem quando adequadamente tratados, mas um percentual não desprezível apresenta recidivas e alguns desses não respondem as terapias convencionais, podendo evoluir para óbito. O desafio é distinguir os pacientes merecedores de procedimentos mais agressivos e, ao mesmo tempo, poupar a maioria de tratamentos e procedimentos desnecessários. Assim, para o planejamento terapêutico e definição da melhor forma de acompanhamento do paciente com CDT, é fundamental avaliar o risco de recorrência e progressão da doença. A principal limitação dos esquemas de estratificação de risco usados atualmente é que eles não levam em conta as implicações de prognóstico das características moleculares do câncer primário.

1.7 Dificuldades no manejo do paciente

No Brasil, assim como no mundo todo, métodos de imagem sensíveis, como a US, têm se tornado cada vez mais acessíveis a uma população cada vez mais idosa, aumentando o número de indivíduos diagnosticados com microcarcinomas, que são definidos pela OMS como carcinomas com até 1 cm de diâmetro, que mesmo sendo confirmados como malignos, apresentam evolução incerta. Apesar dos nódulos serem muito frequentes, o CDT é

relativamente raro e sua evolução geralmente lenta, de forma que a observação clínica pode ser uma opção clínica adequada para nódulos pequenos em indivíduos sem fatores de risco atendidos em centros de atenção primária à saúde. (MARCELLO, 2011).

Embora apresentem um perfil molecular de herança genética similar ao dos tumores diferenciados da tireóide em geral, microcarcinomas possuem epidemiologia diferente (WARD et al., 2006). Afinal, a frequência com que carcinomas não detectados durante a vida são achados em autópsias e os estudos prospectivos na população japonesa portadora de microcarcinomas não operados sugerem que grande parte desses tumores possam não evoluir para formas clinicamente detectáveis (ROSÁRIO et al., 2013).

Contrariando as expectativas, mesmo com diagnóstico precoce, microcarcinomas detectados e tumores inicialmente classificados como de baixo risco, alguns pacientes ainda tem mau prognóstico ou recidiva / metástase após a terapia combinada, como relatado em um coorte, onde as taxas de recorrência de 40 anos foram de até 35% (ZENG et al, 2014). Portanto, é importante para avaliar e determinar as características que afetam recorrência e sobrevida de pacientes com CDT. Além disso, os carcinomas em estágio inicial são difíceis de diagnosticar através de exames de imagem (como tomografia e ultrasonografia) devido à falta de sintomas clínicos e, portanto, métodos mais sensíveis para detectar esses tipos de câncer poderiam ser de grande valia para o estabelecimento de diferentes estratégias terapêuticas, bem como poderiam aumentar as taxas de cura (ISHIKAWA et al, 2006)

Muitos estudos experimentais e clínicos indicaram que os hormônios sexuais podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de tireóide. Poucos dados estão disponíveis sobre a expressão de REs e seu papel nas células da tireóide. A presença de REs foi demonstrada tanto em indivíduos normais e em tumor de tireóide, com graus variáveis de expressão (ZHAI et al, 2003). Até hoje, os REs não são mencionados nas orientações mais recentes para o diagnóstico e gestão do DTC (COOPER et al, 2009). Isto pode ser devido a dados inconclusivos em relação à clínica e expressão de RE em tumores na tireóide. Para fins de investigar essa relação, neste trabalho analisamos a expressão do receptor de estrógeno (RE subtipo α), receptor de progesterona (RP), em CDT usando a técnica de imunohistoquímica (IHC). Além disso, analisamos características clínico patológicas dos pacientes e sua associação com a evolução clínica

1.8 Receptores de estrógeno e progesterona x câncer diferenciado de tireóide

Informações sobre fatores associados com a taxa de progressão e cura dos CDT tem importância fundamental no manejo clínico. Os indicadores prognósticos mais comumente associados para recorrência da doença, metástases e morte incluem a idade do paciente, o subtipo histológico e a extensão do tumor no diagnóstico. Mas outros fatores também têm sido propostos como a ingestão de iodo nas diferentes regiões, o gênero, sendo o feminino considerado o que apresenta uma evolução mais favorável e, mais recentemente, a expressão de receptores de estrógeno e progesterona.

Muitos estudos experimentais e clínicos indicaram que os hormônios sexuais podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de tireóide. O fato do carcinoma de tireóide ser a segunda neoplasia mais frequente em mulheres em idade fértil (DONG et al, 2013) sugere um possível impacto de fatores hormonais e reprodutivos. Consistentemente, nas últimas décadas análises epidemiológicas e resultados experimentais indicaram um possível papel do estrógeno no desenvolvimento e progressão de tumores diferenciados da tireóide (VIVACQUA et al, 2006; ROSÁRIO et al, 2013). Sabe-se que os estrogênios podem regular a proliferação de células da tireóide através da ligação a ambos os receptores de estrogênio (RE), RE α e RE β , exibindo efeitos diferentes na sobrevivência e proliferação das células. Em particular, um efeito proliferativo e anti-apoptótica, e um papel na metastatização foram mostrados para RE α , enquanto que o RE β tem uma ação de diferenciação e pró-apoptótica (ZENG et al, 2008; DONG et al, 2013).

Vários estudos sobre a expressão RE têm sido feitos em ambos os tecidos normais e neoplásicos da tireóide, com resultados extremamente variáveis, principalmente devido à fraca reprodutibilidade dos métodos utilizados. No entanto, existem fortes evidências de que a expressão do RE α é significativamente maior em pacientes com vários tipos de neoplasias da tireóide do que em controles normais, ao passo que o RE β é significativamente menos expressos em tumores do que em tecidos normais da tireóide (Di Vito et al, 2011; CHEN et al, 2008).

O aumento da expressão de RE α e RP em câncer de tireóide pode influenciar o desenvolvimento e a progressão do tumor, particularmente durante condições farmacológicas e fisiológicas caracterizados por altos níveis de estrogênio e progesterona circulantes. De fato, em um estudo de caso-controle recente sobre uma grande população, foi demonstrado que o risco de câncer de tireóide é significativamente correlacionada com menarca precoce e maior número de gestações (XHAARD et al, 2014).

Um aumento do risco de câncer da tireóide foi também documentada em mulheres tratadas com estrogênio por razões ginecológicas, ou em mulheres que tomam pílulas anticoncepcionais orais (RON et al, 1987). Para definir o possível papel do estrógeno e da progesterona no desenvolvimento e progressão de câncer da tireóide, estudos comparando a expressão de RE e RP em tecidos tumorais com as características clínicas e histopatológicas são necessários.

A observação de que o crescimento de alguns tumores, principalmente aqueles derivados dos órgãos reprodutivos (mama, próstata, endométrio, ovário), é regulado pelos hormônios esteróides (estrógenos e andrógenos) tem tido um impacto fundamental na abordagem terapêutica desse grupo de tumores (COTE et al, 1994).

A diferença na incidência de câncer diferenciado de tireóide entre os sexos sugere que o crescimento e a progressão de tumores da tireoide também é influenciada por hormônios sexuais femininos, particularmente estrógeno, como tem sido demonstrado no desenvolvimento e progressão do câncer da mama, do endométrio e cânceres de próstata (YAN et al, 2011; LEUNG et al, 2010).

Desde que foi demonstrado que o crescimento dos carcinomas de mama é regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos para o estrogênio em tumores mamários e a terapia ablativa desse hormônio tem produzido remissão clínica em pacientes com carcinoma de mama. Os tumores que respondem à terapia hormonal expressam altos níveis de RE, enquanto que os tumores que não respondem têm níveis baixos ou indetectáveis (COTE et al, 1994).

Em relação ao câncer diferenciado de tireoide até hoje, existem poucos estudos disponíveis mostrando uma correlação entre RE α expressão negativa e positiva RE β e piores dados histopatológicos (KUMAR et al, 2010). Na medida em que o receptor de progesterona (PR), apenas alguns estudos de expressão em tecidos da tireóide foram publicados (KANSAKAR et al, 2009) e dados concretos ainda não foram produzidos sobre o impacto da expressão RE α e RP na evolução do CDT.

2 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar a imunexpressão de RE e RP em pacientes com Câncer Diferenciado de Tireoide.

Específicos

- Relacionar a expressão desses marcadores no CDT com as características clínicas;
- Avaliar a possível correlação anatomoclínica entre a expressão de RE e/ou RP positivas e variáveis como idade, sexo, tamanho do tumor entre outras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Pacientes e material utilizado

Este estudo, de caráter transversal e observacional, foi desenvolvido a partir de um conjunto de 80 pacientes com carcinoma diferenciado de tireóide, utilizando material referente a peças de tireoidectomia realizadas no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no período de 2010 a 2014, registradas e integrantes dos Arquivos do Serviço de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC) e que foram coletadas durante o ato cirúrgico, fixadas em formalina neutra a 10%, durante 12 a 24 horas, processadas automaticamente e incluídas em parafina. A seleção de tecido de tireóide normal foi realizada nas peças do mesmo Serviço de Patologia e foram escolhidas áreas distantes do tumor (margem cirúrgica), observando-se cuidadosamente e selecionando pacientes que não apresentavam Tireoidite de Hashimoto, bócio ou adenoma previamente diagnosticados. Foram excluídos todos os casos com amostras insuficientes, mal fixadas ou inadequadas. Este trabalho é o primeiro a pesquisar receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP) desenvolvido no Estado do Ceará e foi financiado pelo CNPQ.

3.2 – *Tissue Microarray*

Analisou-se o material a ser estudado (tecido de tireóide normal e tecido tumoral), através das lâminas coradas pelo método HE, delimitou-se a área representativa do material em cada lâmina e em seguida marcou-se no bloco de parafina a mesma área analisada na lâmina e em seguida retirou-se os cilindros no local exato onde se encontrava o tecido a ser analisado.

A construção dos blocos de *tissue microarray* seguiu a técnica modificada de Kononen e colaboradores (JUHA KONONEN et al, 1998), utilizando uma base fixa a partir de um kit comercial (Arraymold®). Foram confeccionados 3 blocos cada um com 30 amostras, em duplicata, do material a ser estudado, com um total de 60 cilindros no “bloco receptor”, com espaçamentos de 2,2 mm de distância entre os centros dos cilindros.

Durante a retirada dos tecidos dos “blocos doadores”, o *punch* era inserido de forma perpendicular a fim de proporcionar a adequada retirada do cilindro com a parte previamente selecionada e representativa da amostra.

As amostras tissulares parafinadas do “bloco doador” foram retiradas com o auxílio de um *punch* de biópsia de 2mm de diâmetro (*BiopsyPunch - Miltex*), inserido na área previamente selecionada do bloco. Essas amostras foram retiradas da agulha e inseridas no “bloco receptor” com auxílio de um bastão apropriado e encaixado no bloco receptor com auxílio de uma lâmina.

Em cada vértice dos *microarray* foi colocada secção histológica distinta das estudadas, para servir de controle interno dos casos. Foram inseridos controles internos de tecido de mama normal e tecido de fígado em cada bloco. Dessa forma, cada *array* construído contém 60 cilindros, sendo 56 do material objeto da pesquisa (tumor a maioria em duplicata e tecido normal), duas amostras de tecidos de mama como controles internos positivos a serem testados e duas de tecido de fígado como controle negativo.

Após o preenchimento do “bloco receptor” com todos os cilindros dos “blocos doadores”, foi despejada uma fina camada de parafina derretida sobre o bloco, que foi posteriormente aquecido em uma estufa a 60 °C durante 15 minutos, e depois resfriado a temperatura ambiente, a fim de se obter uma melhor aderência dos cilindros no bloco receptor.

Os cortes dos blocos de *tissue microarray* foram realizados em micrótomo Leica RM2235, com 4 µm de espessura, colocados em lâminas silanizadas e encaminhados para realização de imunohistoquímica.

3.3 - Imunohistoquímica

As lâminas silanizadas foram colocadas em um suporte plano e levadas para a estufa, com temperatura estabilizada a 60°C, durante uma hora, a fim de derreter o excesso de parafina e melhorar a aderência dos tecidos à lâmina.

Ao mesmo tempo, iniciou-se a preparação do tampão de recuperação antigênica, utilizando-se o tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution*, pH=9, código de referência K8000 – *Dako*[®], na diluição 1:50, que foi conservado em geladeira a 8°C. Em seguida, essa solução de 1500 ml (30 ml de tampão de recuperação antigênica + 1470 ml de água destilada) foi colocada em um tanque do módulo de pré-tratamento *Dako PT Link*[®], aparelho que proporciona um banho maria fechado, com temperatura monitorizada e controlada por computador. Foi realizado o pré-aquecimento do sistema até 65°C durante trinta minutos.

Após retiradas da estufa, as lâminas foram colocadas em prateleiras, as quais foram posicionadas no tanque do *Dako*[®] *PT Link*, e o sistema aquecido até a temperatura de

97°C, permanecendo nessa temperatura por trinta minutos. A seguir, o sistema foi novamente resfriado até 65°C, com o tempo total do processo de aproximadamente uma hora e meia. Dessa forma, há a recuperação dos epítomos antigênicos e a reidratação dos cortes histológicos, permitindo, assim, uma melhor ligação dos anticorpos aos epítomos.

Figura 1 – Gráfico da reação do *Dako*[®] *PT Link*, para recuperação antigênica.

O material então foi retirado dos tanques, e as lâminas colocadas em um borrel contendo tampão de lavagem, durante três minutos, por três vezes. Para a lavagem das lâminas foi utilizado o *Wash Buffer Envision Flex*, pH=7,6, *Dako*[®], na diluição de 1:20.

Após essa etapa de lavagem, as lâminas foram retiradas do tampão de lavagem e marcadas com uma caneta especial hidrofóbica (*Dako*[®] *Pen* – referência S2002), que delimita a área em torno do corte histológico, impedindo o escoamento das soluções. Foram então submetidas a peróxido de hidrogênio a 5% durante dez minutos, com o objetivo de bloquear a peroxidase dos tecidos e evitar reação de fundo quando da etapa de coloração.

Posteriormente, foi efetuada nova lavagem das lâminas com tampão de lavagem por mais três minutos, e então as lâminas foram colocadas nas câmaras de incubação, onde foi realizada a incubação com o anticorpo primário.

Foram utilizados o Anticorpo Monoclonal Anti-RP Humano, Clone PgR 636, referência M3569, da DAKO® em diluição de 1:100, e Anticorpo Monoclonal Anti-RE Humano Dako®, em diluição de 1:50. Foi realizada a aplicação do anticorpo primário, lâmina por lâmina, e o conjunto permaneceu em incubação por uma hora, sendo realizadas três lavagens seguidas com o *Wash Buffer Envision Flex* Dako®, durante três minutos cada lavagem.

As lâminas então foram colocadas na prateleira e foi realizada a incubação com o *Linker Envision Flex Mouse*, código de referência K8012/K8022 - Dako®, durante trinta minutos.

A etapa seguinte se deu através da incubação com o polímero *Dako® Envision + Dual Link System* – HRP. A incubação do polímero foi realizada durante trinta minutos. Em seguida, foram realizadas mais três lavagens com o tampão de lavagem, durante três minutos cada lavagem, e, logo após, foi feita a coloração com a incubação do cromógeno *Dako® DAB* durante cinco minutos e posterior lavagem das lâminas em água corrente.

A seguir, foi feita a contracoloração com hematoxilina (*EnVision Flex Hematoxylin*) e realizadas três passagens das lâminas em álcool absoluto, para desidratação e três passagens em xilol, para diafanização ou clareamento. Por último, foram realizadas as montagens das lamínulas utilizando o Bálsamo do Canadá.

3.4 – Escores

Foram considerados positivos os casos que apresentaram uma ou mais células com imunomarcagem citoplasmática e/ou nuclear, baseado em estudos prévios (TAVANGAR et al, 2007; KANSAKAR et al, 2009; ZHAI et al, 2003; LIUA et al, 2014)

Foi realizada a leitura e observando os casos positivos na seguinte escala de coloração; NEGATIVO (0), <5% (1), 5- 25% (2) e > 25% (3), tanto para marcação citoplasmática como nuclear.

3.5 – Controles

Os controles positivos para RE e RP foram obtidos a partir de secções de tecido de mama normal, conforme orientação do fabricante. Os controles negativos foram obtidos a partir da supressão do anticorpo primário durante a realização da imunohistoquímica.

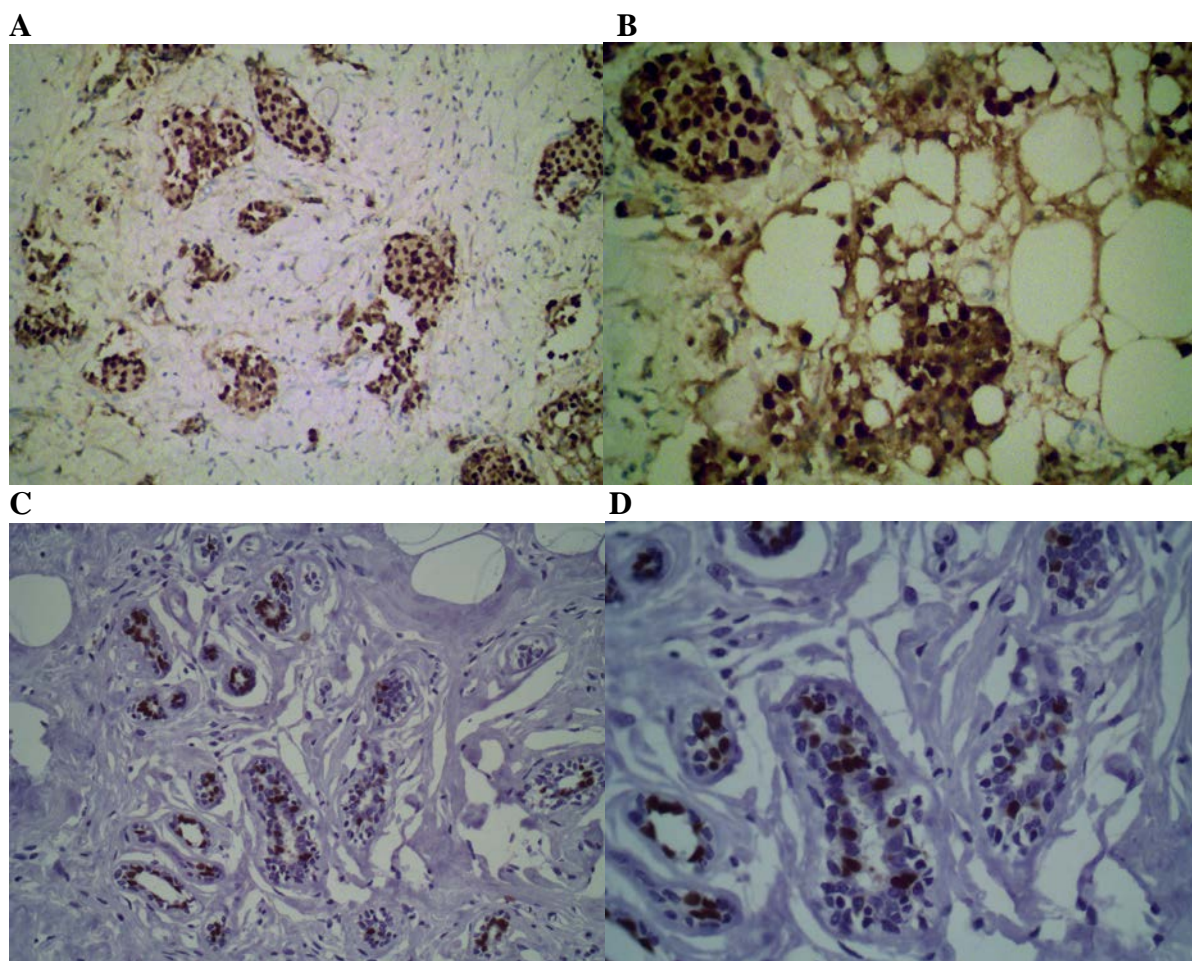


Figura 2. A- RE + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 200X; B- RE + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 400X; C- RP + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 200X; D- RE + Controle POSITIVO, tecido de mama normal, marcação nuclear e citoplasmática, 400X.

3.6 - Avaliação dos resultados

Os preparados histológicos para RE e RP foram estudados detalhadamente pelo autor deste trabalho e analisados por um patologista experiente, sempre em microscópio Olympus BX41[®].

3.7 - Análise Estatística

Os dados quantitativos contínuos foram descritos como média \pm desvio padrão. Os dados de frequência foram descritos como percentuais. Para testar a diferença entre dois grupos de variáveis categóricas foi usado o teste exato de Fisher. Para testar a diferença entre

dois grupos de variáveis quantitativas contínuas foi usado o teste t não pareado de Student. Diferenças estatisticamente significantes foram indicadas quando $P \leq 0,05$.

3.8 - Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos

O plano de pesquisa deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o número do CAAE 39389514.1.0000.5054, e aprovado em 30/04/2015, número do parecer 1.044.047. Foi submetido ao site da Plataforma Brasil para registro da pesquisa. Foram tomados os cuidados necessários para a preservação de condições de biossegurança, incluindo a prevenção de acidentes em laboratório, e o manejo e acondicionamento correto dos materiais utilizados.

4 RESULTADOS

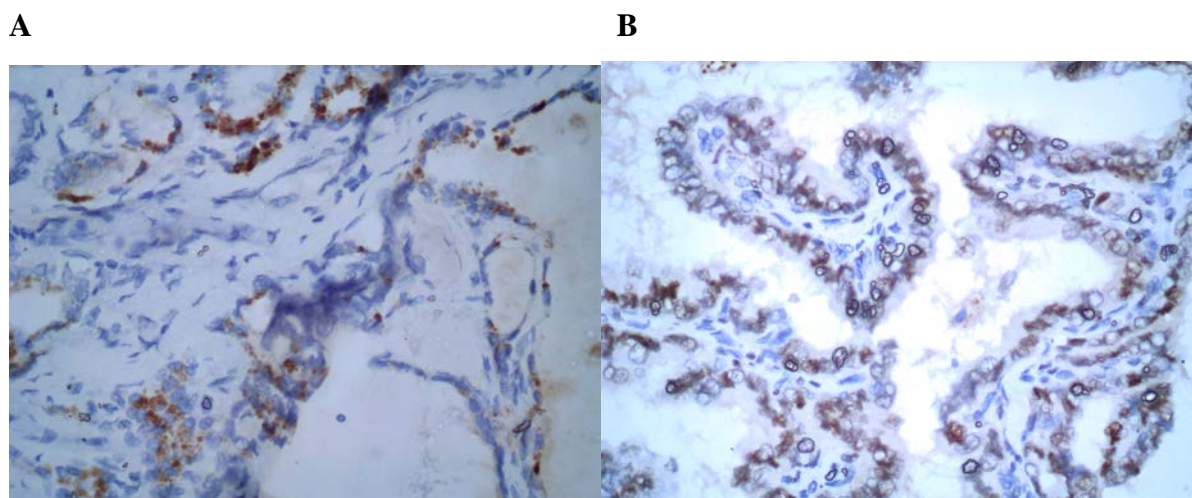


Figura 3. **A-** Tecido de câncer diferenciado de tireóide com marcação citoplasmática de RE α 5-25%. **B-** Tecido de câncer diferenciado de tireóide marcação nuclear de RE > 25%. (400x)

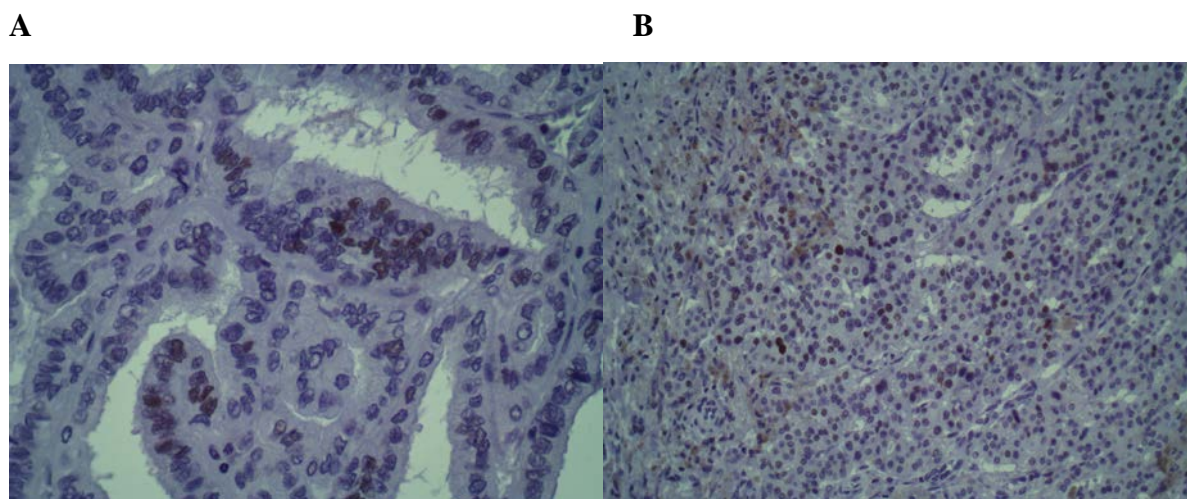


Figura 4. **A-** Tecido de câncer diferenciado de tireóide com marcação nuclear de RP 5-25%. **B-** Tecido de câncer diferenciado de tireóide com marcação nuclear de RP > 25%. (400x)

4.1 Imunomarcção e Variáveis Clínico-Patológicas

Foram incluídos no estudo 80 pacientes, onde 4 casos apresentaram carcinoma folicular e papilífero clássico concomitante e 80 casos são Carcinomas Papilíferos que apresentam, Variantes Foliculares, Clássicas, Células Altas, Esclerosante Difusa e Cibriforme Morular, totalizando 84 casos.

Foi realizada a comparação da imunexpressão dos marcadores em cada variável clínico-patológica, tais como: tipos histológicos papilífero e folicular, variantes clássica, folicular e outras, sexos masculino e feminino, idade (<40 anos e \geq 40 anos), dimensão do

tumor (<1 cm e >1cm), invasão angiolinfática, invasão da cápsula, multicentricidade e presença de Tireoidite de Hashimoto associada.

Observou-se o predomínio de pacientes do sexo feminino (87,5%); com idade superior ou igual a 40 anos (68,57%); média de idade \pm 49,12; tumor com dimensão >1cm (69,04%); tipo histológico papilífero (95,24%); com localização em único lobo, não multicêntrico, (61,90%); ausência de invasão angiolinfática (67,85%); ausência de invasão capsular (75%); sem Tireoidite de Hashimoto (73,80%). (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Características clínicas dos 80 pacientes com câncer diferenciado de tireóide analisados no estudo.

	N/total	%
SEXO		
Feminino	70/80	87,5
Masculino	10/80	12,5
IDADE		
<40 anos	26/80	32,5
>40anos	54/80	67,5
TAMANHO DO TUMOR		
<1cm	26/80	32,5
>1cm	54/80	67,5

Tabela 2. Tipos histológicos dos 84 casos de CDT analisados.

TIPO HISTOLÓGICO	N/total	%
Papilífero	80/84	95,24
Folicular	4/84	4,76
SUBTIPOS		
Clássico	24/84	28,57
Folicular	24/84	28,57
Células Altas	6/84	7,14
Células Colunares	1/84	1,19
Cibriforme-morular	1/84	1,19
Esclerosante Difusa	1/84	1,19
Microcarcinomas	26/84	30,95
Céls Oxifílicas (Hurtlhe)	1/84	1,19

Tabela 3. Associação entre a presença de imunexpressão de Receptor Estrogênico (RE+) no tumor e variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	RE + (n/total)	%	P
Sexo			
Masculino	5/10	50	0.73
Feminino	28/70	40	
Idade (anos)			
<40	5/20	25	0.19
>40	27/60	45	
Tamanho do tumor			
<1cm	12/26	46	0.47
>1cm	21/58	36	
Tipo histológico			
Papilífero	32/79	41	0.65
Folicular	1/4	25	
Tireoidite de Hashimoto			
Presente	8/22	36	1.00
Ausente	24/62	39	
Invasão de Cápsula			
Presente	8/21	38	1.00
Ausente	25/63	40	
Invasão Linfática			
Presente	9/27	33	0.48
Ausente	24/57	42	
Multicentricidade			
Presente	12	20	0.82
Ausente	21	31	

Tabela 4. Associação entre a presença de imunexpressão de Receptor de Progesterona (RP+) no tumor e variáveis clínico-patológicas.

VARIÁVEIS	RP + (n/total)	%	P
Sexo			
Masculino	6/10	60	0.1879
Feminino	32/70	45,71	
Idade			
<40 anos	8/20	40	0.7958
>40 anos	29/60	48,33	
Tamanho			
<1cm	11/26	42,30	0.8142
>1cm	27/58	46,55	
Histologia			
Papilífero	42/80	52,5	0.6198
Folicular	3/4	75	
Tireoidite de Hashimoto			
Presente	11/22	50	0.8049
Ausente	28/62	45,16	
Invasão capsular			
Presente	11/21	52,38	0.6210
Ausente	29/63	46,03	
Invasão Linfática			
Presente			0.6325
Ausente	12/27	44,44	
	27/57	47,36	
Multicentricidade			
Presente	12/32	37,5	0.1798
Ausente	28/52	53,84	

4.2 Distribuição da imunexpressão de RE em células tumorais.

A comparação da expressão de RE nas células tumorais, considerando o sexo, demonstrou que os homens apresentam maior expressão (5/10=50%) quando comparados com as mulheres (28/70 = 40%). Contudo essa diferença não foi significativa (P= 0,7331, tabela 1 e 3).

Tabela 5. Expressão de RE em tumores de pacientes dos sexos feminino e masculino.

RE	SEXO	
	MASCULINO	FEMININO
0	5	42
1	3	18
2	1	5
3	1	5
TOTAL	10	70

Quanto à expressão de RE em tumores de pacientes >40 anos (24/60 = 40%) a expressão foi maior do que quando comparado com paciente <40 anos (5/20 = 25%), contudo esses dados não apresentaram significado estatístico (P = 0,1868, tabela 1 e 4).

Tabela 6. Expressão de RE em tumores de pacientes < 40 anos e >40 anos.

RE	≤ 40	>40
0	15	33
1	3	19
2	2	3
3	0	2
TOTAL	20	60

A expressão de RE em tumores <1cm (12/26 = 46,15%) foi maior comparando com tumores >1cm (21/58 = 36,20%), (P= 0,4706, tabela 1 e 5)

Tabela 7. Expressão de RE em tumores <1cm (microcarcinomas) e >1cm.

RE	≤ 1cm	>1cm
0	14	37
1	9	12
2	3	3
3	0	6
TOTAL	26	58

Considerando o tipo histológico papilífero e folicular, demonstrou que os carcinomas diferenciados do tipo papilífero expressam mais RE ($32/80 = 40\%$), quando comparado com carcinomas diferenciados do tipo folicular ($1/4 = 25\%$), sem diferença estatística significativa ($p=0,6480$, tabela 1 e 6).

Tabela 8. Expressão de RP em carcinoma diferenciado de tireoide do tipo papilífero e folicular.

RE	TIPO HISTOLÓGICO	
	PAPILÍFERO	FOLICULAR
0	48	3
1	21	0
2	5	1
3	6	0
TOTAL	80	4

Quando se compara a expressão de RE nas variantes clássicas e não clássicas, observa-se que a expressão de RE nas variantes não clássicas ($15/34 = 44,12\%$) é maior que nas variantes clássicas ($6/24 = 25\%$), não sendo essa diferença significativa ($P= 0.1714$, tabela 1 e 9).

Tabela 9. Expressão de RE em pacientes com CDT variantes clássicas e não clássicas.

RE escores	CLÁSSICO	NÃO CLÁSSICO
0	18	19
1	4	8
2	0	3
3	2	4
TOTAL	24	34

Considerando a localização do tumor, a expressão de RE nos tumores não multicêntricos ($21/52 = 40,38\%$) foi maior que a expressão nos tumores multicêntricos ($12/32 = 37,50\%$), Contudo essa diferença não foi significativa ($p= 0,8221$, tabela 1 e 10).

Tabela 10. Expressão de RE em tumores de tireoide quanto a localização, multicêntricos e não multicêntricos.

RE	LOCALIZAÇÃO DO TUMOR	
	MULTICÊNTRICO	NÃO MULTICÊNTRICO
0	20	31
1	8	13
2	2	4
3	2	4
TOTAL	32	52

Quando se compara a expressão de RE em pacientes sem invasão linfática ($24/57 = 42,10\%$) observa-se que é maior que a expressão de RE em pacientes com invasão linfática ($9/27 = 33,33\%$), não sendo estatisticamente significativa, ($P=0,4824$, tabela 1 e 11).

Tabela 11. Expressão de RE em tumores com invasão linfática e sem invasão linfática.

RE	INVASÃO LINFÁTICA	
	COM	SEM
0	18	33
1	4	17
2	3	3
3	2	4
TOTAL	27	57

Quanto à expressão de RE em pacientes com invasão capsular ($8/21 = 38,09\%$), é menor que a expressão em pacientes sem invasão capsular ($25/63 = 39,68\%$), dado estatisticamente não representativo, ($P = 1.0000$, tabela 1 e 12).

Tabela 12. Expressão de RE em tumores com invasão capsular e sem invasão capsular.

RE	INVASÃO CAPSULAR	
	COM	SEM
0	13	38
1	4	17
2	1	5
3	3	3
TOTAL	21	63

Quanto à presença de Tireoidite de Hashimoto a expressão de RE foi menor nos pacientes com Tireoidite de Hashimoto ($8/22 = 36,36\%$) comparando com os pacientes sem a doença

(24/62 = 38,70%), porém esse resultado não teve significado estatístico, ($P = 1.0000$, tabela 1 e 13).

Tabela 13. Expressão de RE em pacientes com CDT com Tireoidite de Hashimoto e sem Tireoidite de Hashimoto.

RE	TIREOIDITE DE HASHIMOTO	
	SEM	COM
0	38	14
1	16	5
2	5	1
3	3	2
TOTAL	62	22

4.3 Distribuição da imunexpressão de RP em células tumorais.

A comparação da expressão de RP nas células tumorais, considerando o sexo, demonstrou que os homens apresentam uma maior expressão (6/10=60%) quando comparado com as mulheres (22/70 = 45,71%). Contudo essa diferença não foi significativa ($P= 0,1879$, tabela 1 e 14).

Tabela 14. Expressão de RP em tumores de pacientes dos sexos feminino e masculino.

RP	SEXO	
	MASCULINO	FEMININO
0	4	48
1	5	7
2	1	8
3	0	7
TOTAL	10	70

Considerando o tipo histológico papilífero e folicular, demonstrou-se que os carcinomas diferenciados do tipo papilífero apresentam maior expressão de RP (38/80 = 47,55%), quando comparado com carcinomas diferenciados do tipo folicular RP (1/4 = 25%), sem diferença estatística significativa ($P=0,6198$, tabela 1 e 13).

Tabela 15. Expressão de RP em carcinoma diferenciado de tireoide do tipo papilífero e folicular.

RP	TIPO HISTOLÓGICO	
	PAPILÍFERO	FOLICULAR
0	42	3
1	23	0
2	8	1
3	7	0
TOTAL	80	4

Quanto à expressão de RP em tumores de pacientes >40 anos ($28/60 = 46,66\%$) a expressão foi maior do que quando comparado com paciente <40 anos ($8/20 = 40\%$), contudo esses dados não apresentaram significado estatístico ($P = 0,7958$ tabela 1 e 16).

Tabela 16. Expressão de RP em tumores de tireoide de pacientes >40 anos e ≤40 anos.

RP	≤ 40 ANOS	>40 ANOS
0	12	32
1	4	18
2	3	4
3	1	6
TOTAL	20	60

A expressão de RP em tumores <1cm ($11/26 = 42,30\%$) foi menor comparando com tumores >1cm ($27/58 = 46,55\%$), ($P = 0,8142$, tabela 1 e 17).

Tabela 17. Expressão de RP em tumores de tireoide ≤1cm (microcarcinomas) e >1cm.

RP	≤1cm	>1cm
0	15	31
1	8	14
2	3	6
3	0	7
TOTAL	26	58

Quanto à presença de Tireoidite de Hashimoto a expressão de RP foi maior nos pacientes com Tireoidite de Hashimoto ($11/22 = 50\%$) comparando com os pacientes sem a doença ($28/62 = 45,16\%$), porém esse resultado não teve significado estatístico, ($P = 0,8049$, tabela 1 e 18).

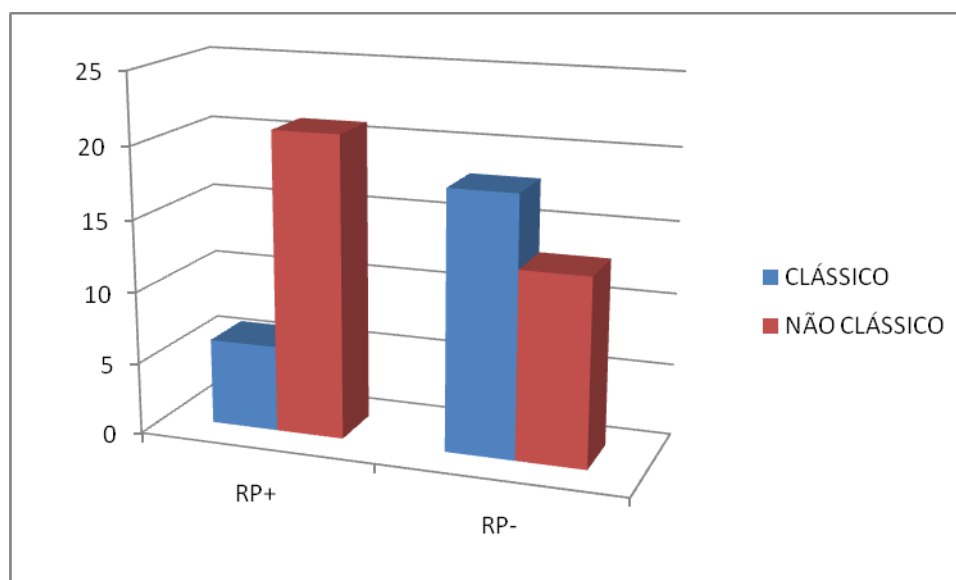
Tabela 18. Expressão de RP em pacientes com Tireoidite de Hashimoto e sem Tireoidite de Hashimoto.

TIREOIDITE DE HASHIMOTO		
RP	SEM	COM
0	34	11
1	16	7
2	7	2
3	5	2
TOTAL	62	22

Quando se compara a expressão de RP nas variantes clássicas e não clássicas, observa-se que a expressão de RP nas variantes não clássicas ($21/34 = 61,76\%$) é maior que nas variantes clássicas ($6/24 = 25\%$), sendo essa diferença significativa ($P= 0.0078$, tabela 19).

Tabela 19. Expressão de RP em pacientes com CDT variantes clássicas e não clássicas.

RP	CLÁSSICO	NÃO CLÁSSICO
0	18	13
1	4	10
2	2	4
3	0	7
TOTAL	24	34

Gráfico 1. Expressão de RP em pacientes com CDT variantes clássicas e não clássicas.

Quanto à localização do tumor, a expressão de RP nos tumores não multicêntricos ($28/52 = 53,84\%$) foi maior que a expressão nos tumores multicêntricos ($12/32 = 37,50\%$), Contudo essa diferença não foi significativa ($p= 0,1798$, tabela 1 e 20).

Tabela 20. Expressão de RP em tumores de tireoide quanto a localização, multicêntricos e não multicêntricos.

RP	LOCALIZAÇÃO DO TUMOR	
	MULTICÊNTRICO	NÃO MULTICÊNTRICO
0	20	24
1	4	20
2	4	5
3	4	3
TOTAL	32	52

Quando se compara a expressão de RP em pacientes sem invasão linfática (27/57 = 47,36%) observa-se que é maior que a expressão de RP em pacientes com invasão linfática (12/27 = 44,44%), não sendo estatisticamente significante, (P= 0,6325, tabela 1 e 21).

Tabela 21. Expressão de RP em tumores de tireoide com invasão linfática e sem invasão linfática.

RP	INVASÃO LINFÁTICA	
	COM	SEM
0	15	30
1	6	17
2	3	6
3	3	4
TOTAL	27	57

Quanto à expressão de RP em pacientes com invasão capsular (11/21 = 52,38%) é maior que a expressão em pacientes sem invasão capsular (28/63 = 44,44%), dado estatisticamente não representativo, (P = 0, 6210 tabela 1 e 22).

Tabela 22. Expressão de RP em CDT com invasão capsular e sem invasão capsular.

RP	INVASÃO CAPSULAR	
	SEM	COM
0	35	10
1	19	4
2	7	2
3	2	5
TOTAL	63	21

4.4 Distribuição da imunoexpressão de RE x RP em células tumorais.

Com os resultados obtidos podemos observar que a expressão RP (47,5%) foi maior que a expressão de RE α (41,25%) em pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide. Assim

como a expressão de RP foi maior em relação à expressão de RE na maioria das variáveis clínicas analisadas, sendo menor a expressão somente em relação ao tamanho, nos tumores ≤ 1 cm, onde a expressão de RE α (46,15%) foi maior que a de RP (42,30%), e igual em relação a variantes clássicas onde a expressão de RE α (25%) apresentou-se semelhante a de RP (25%). Quanto ao tipo histológico, no carcinoma folicular a expressão de RE α (25%) apresentou-se igual a expressão de RP (25%) e quanto à localização do tumor, as expressões de RE(37,5%) e RP (37,5%) são iguais no carcinoma multicêntrico.

Tabela 23. Relação entre a expressão de RE e RP em carcinoma diferenciado de tireoide.

VARIÁVEIS	RP +/total	RP %	RE +/total	RE %
SEXO				
MASCULINO	6/10	60	5/10	50
FEMININO	32/70	45,71	28/70	40
IDADE				
≤ 40 ANOS	8/20	40	5/20	25
> 40 ANOS	29/60	48,33	27/60	45
TAMANHO				
≤ 1 cm	11/26	42,30	12/26	46,15
> 1 cm	27/58	46,55	21/58	36,20
TIOPO HISTOLÓGICO				
PAPILÍFERO	38/80	47,5	32/80	40
FOLICULAR	1 / 4	25	1 / 4	25
TIREOIDITE DE HASHIMOTO				
SIM	11/22	50	8/22	36,36
NÃO	28/62	45,16	24/62	38,70
INVASÃO CAPSULAR				
SIM	11/22	52,38	8/22	38,09
NÃO	29/62	46,03	25/62	39,68
INVASÃO LINFÁTICA				
SIM	12/27	44,44	9/27	33,33
NÃO	27/57	47,36	24/57	42,10
VARIANTES				
CLÁSSICAS	6/24	25	6/24	25
NÃO CLÁSSICAS	21/34	61,76	15/34	44,11

MULTICÊNTRICO				
SIM	12/32	37,5	12/32	37,5
NÃO	28/52	53,84	21/52	40,38

4.4 Distribuição da imunexpressão de RE e RP em células do tecido normal adjacente

Observou-se que a expressão de RE α (77,77%) é maior que a expressão de RP (47,05%) para as células de tecido normal. (tabela 22)

Tabela 24. Expressão de RE α e RP em tecidos normais.

	RE	RP
NEGATIVO	4 (22,22%)	9 (52,95%)
POSITIVO	14 (77,77%)	8 (47,05%)
TOTAL	18	17

5 DISCUSSÃO

Observações anteriores de que o desenvolvimento de doenças de tireóide está relacionado com o sexo e a idade sugerem que os hormônios sexuais e seus receptores podem estar envolvidos na patogênese de doenças desta glândula (COOK et al, 2009; HELLEVIK et al, 2009; LEVI et al, 1993). Este fato é uma das razões por que as mulheres muitas vezes sofrem relativamente alta incidência de doenças tireoideanas. No estudo de Liu et al (LIUA et al, 2014), descobriu-se que RE foi expresso em tecido tireoidiano normal, sugerindo que o estrogênio pode agir diretamente sobre o tecido tireoidiano via receptor.

Ambos os subtipos de RE têm sido demonstrados em tecidos normais e neoplásicos da tireóide, e o nível de expressão de RE difere entre o tecido tireoidiano normal e tecidos tireoidianos neoplásicos (XHAARD et al, 2014; MANOLE et al, 2011). Alguns autores encontraram um aumento da expressão do RE α em CDT em relação ao tecido normal usando imunohistoquímica (YANE et al, 1994; KANSAKAR et al, 2009; TAVANGAR et al, 2007), ao passo que outros não encontraram qualquer diferença na expressão de RE α em tumores da tireóide em relação aos tecidos normais (VAIMAN et al., 2010; SANTIN et al., 2011). O estudo de Liua et al., demonstra que em comparação com o tecido da tireóide normal a expressão de RE α é aumentada e a expressão RE β diminuída em neoplasias da tireóide (Liua ET al., 2014).

O estudo de Kansakar et al, encontrou que as taxas positivas de RE e RP em 74 pacientes com CDT foram 50,0% e 73,0%, respectivamente, demonstrando que RE e RP são altamente expressos no CDT em comparação com o tecido normal adjacente, o que evidencia que esses receptores desempenham um papel importante na patogênese do câncer de tireóide (KANSAKAR et al, 2009). O estudo de Vannucchi et al, demonstrou que RE α e RP foram expressos em CDT (66% e 76% respectivamente), Semelhante aos achados de Kansakar et al e Vannucchi et al, mencionados acima, demonstrou-se no estudo atual que a expressão de RE α e RP ocorrem tanto em tecidos normais quanto neoplásicos e que com os resultados obtidos encontrou-se que a expressão RP (47,5%) foi maior que a expressão de RE α (41,25%) em pacientes com carcinoma de tireóide. Observou-se ainda que a expressão de RE α (77,77%) é maior que a expressão de RP (47,05%) para as células de tecido normal adjacente.

Tavangar et al, descobriram que a expressão de RE, em diferentes grupos etários não mostrou diferença significativa entre homens e mulheres, e não estava relacionado à invasão linfática ou invasão capsular (TAVANGAR et al, 2007). Dados semelhantes foram detectados no nosso estudo comparando-se a expressão de RE α nas células tumorais, considerando o sexo, demonstrou-se que os homens apresentam maior expressão (5/10=50%) quando comparados com as mulheres (28/70 = 40%), contudo essa diferença não foi significativa. Quanto à expressão de RE α em tumores em relação à faixa etária, em pacientes >40 anos (24/60 = 40%) a expressão foi maior em pacientes \leq 40 anos (5/20 = 25%), contudo esses dados também não apresentaram significado estatístico. Quando se comparou a expressão de RE α em pacientes sem invasão linfática (24/57 = 42,10%) observou-se que é maior que a expressão de RE α em pacientes com invasão linfática (9/27 = 33,33%), não sendo estatisticamente significativa. Quanto à expressão de RE em pacientes com invasão capsular (8/21 = 38,09%) é menor que a expressão em pacientes sem invasão capsular (25/63 = 39,68%), dado estatisticamente não representativo.

Kansakar et al relatou não haver diferenças significativas entre as faixas etárias, gêneros e subtipos histológicos na expressão de RE e RP. A expressão de RP em carcinoma papilífero de tireóide foi significativamente maior do que no carcinoma folicular de tireoide, mas não houve diferenças significativas entre outros grupos (KANSAKAR et al, 2009). Semelhante ao nosso estudo onde observamos que CPT apresentam maior expressão de RP (38/80 = 47,55%), quando comparado com CFT onde RP (1/4 = 25%), porém esse achado não apresenta diferença estatística significativa.

Em estudo mais recente sobre a expressão dos RE e RP em 182 pacientes femininos e masculinos com diagnóstico não incidental corrobora. Foi apresentada uma tendência em direção a uma maior prevalência de metástases locais em RE e RP expressos em tumores, o que possivelmente indica um comportamento mais agressivo. Por isso, o conjunto dos resultados relatados no estudo defendem a associação entre a expressão de receptores hormonais sexuais RE e RP uma apresentação de tumor mais agressivo. Embora nenhum impacto no resultado foi encontrado, a avaliação da expressão do receptor RE e RP pode adicionar *insights* sobre o comportamento biológico dos tumores e pode modificar o seguimento, particularmente em mulheres com doenças persistentes. (VANNUCHI et al., 2015).

Com a análise dos dados obtidos foi possível observar que a expressão de RE α (77,77%) foi maior em tecidos normais adjacentes em relação aos tecidos tumorais RE α (41,25%), em relação à expressão de RP podemos observar que foi semelhante entre os tecidos normais RP

(47,05%) e tecidos tumorais RP (47,5%), como também foi possível observar que a expressão de RP é maior em relação à expressão de RE α em tecidos tumorais considerando a maioria das variáveis analisadas neste estudo.

Encontramos no nosso estudo que a expressão de RP nas variantes não clássicas ($21/34 = 61,76\%$) quando comparada a expressão de RP ($6/24 = 25\%$) nas variantes clássicas foi maior, apresentando significado estatístico.

6 CONCLUSÃO

Embora as taxas positivas de RE α e RP em câncer de tireóide tenham sido diferentes dos estudos anteriores, os resultados de todos estes estudos indicaram que o estrógeno e a progesterona, assim como seus receptores, são relevantes para a regulação do crescimento do câncer de tireóide.

Equivalente a estudos anteriores (Manole et al., 2001, Lee et al. 2005) no presente estudo encontramos uma expressão de RE e RP tanto em indivíduos normais como em tecidos tumorais de tireóide. Observou-se que a expressão de RP é maior em relação à expressão de RE α em tecidos tumorais. Assim como a expressão de RP foi maior em relação à expressão de RE α na maioria das variáveis clínicas analisadas, sendo menor a expressão somente em relação ao tamanho, onde nos tumores ≤ 1 cm a expressão de RE α (46,15%) foi maior que a de RP (42,30%), e igual em relação a variantes clássicas onde a expressão de RE α (25%) apresentou-se semelhante a de RP (25%). Quanto ao tipo histológico, no carcinoma folicular a expressão de RE α (25%) apresentou-se igual a expressão de RP (25%) e quanto à localização do tumor, as expressões de RE (37,5%) e RP (37,5%) são iguais no carcinoma multicêntrico. Ao contrário do que se observou em tecidos normais adjacentes onde a expressão de RE α (77,77%) é maior que a expressão de RP (47,05). Em conclusão, os resultados obtidos comprovam as evidências de que os RE e RP estão envolvidos na patogênese do câncer de tireóide em mulheres.

No entanto, o nosso conhecimento sobre a influência destes receptores sobre o tumor é ainda muito limitada. Estudos mais detalhados são necessários para preencher esta lacuna, o que pode ter consequências consideráveis para o tratamento de câncer de tireóide em mulheres.

REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério da Saúde - INCA, Rio de Janeiro; 2011. [Citado 2014 set 11].

Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.

Chen GG, Vlantis AC, Zeng Q & van Hasselt CA. Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer. *Current Cancer Drug & Targets* 2008 8 367-77.

Coeli C. M, Brito A. S, Barbosa F. S, Ribeiro M. G, Sieiro A. P. A.V, Vaisman M. Incidência e Mortalidade por Câncer de Tireóide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 49 nº 4 Agosto 2005.

Collins F, MacPherson S, Brown P et al: Expression of oestrogen receptors, ER alpha, ER beta and ERbeta variants, in endometrial and cancers and evidence that prostaglandin F may play a role in regulating expression of ER alpha. *BMC Cancer*, 2009; 9: 330.

Cook M.B, S.M. Dawsey, N.D. Freedman, P.D. Inskip, S.M. Wichner, S.M. Quraishi, S.S. Devesa, K.A. McGlynn, Sex disparities in cancer incidence by period and age, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18 (2009) 1174–1182.

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2006;16(2):1-24.

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M et al. 2009 Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19 1167–1214.

Cordioli MI, Canalli MH, Coral MH. Increase incidence of thyroid cancer in Florianopolis, Brazil: comparative study of diagnosed cases in 2000 and 2005. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009 Jun;53(4):453-60.

Cote RJ, Taylor CR. Immunohistochemical detection of steroid hormone receptors. In: Taylor CR, Cote RJ, eds. *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. 2th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. (Major problems in pathology; vol. 19).

DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71:414-24.

Di Vito M, De Santis E, Perrone GA, Mari E, Giordano MC, De Antoni E, Coppola L, Fadda G, Tafani M, Carpi A & Russo MA. Overexpression of estrogen receptor- α in human papillary thyroid carcinomas studied by laser- capture microdissection and molecular biology. *Cancer Science* 2011 102 1921-7.

Dillon LW, Lehman CE, Wang YH. The role of fragile sites in sporadic papillary thyroid carcinoma. *J Thyroid Res*. 2012;2012:1-12.

Dong W, Zhang H, Li J, Guan H, He L, Wang Z, Shan Z & Teng W. Estrogen Induces Metastatic Potential of Papillary Thyroid Cancer Cells through Estrogen Receptor α and β . *International Journal of Endocrinology* 2013, 2013 941568.

Elisei R, Bottici V, Luchetti F, Di Coscio G, Romei C, Grasso L, et al. Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:163-8.

Furlanetto TW, Peccin S, de OSMA, dos SZA, dos Reis PS, Genro SK, et al. Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women. *Rev Assoc Med Bras*. 2000 Oct-dec;46(4):331-4.

GLOBOCAN, 2012

Grodski S, Brown T, Sidhu S, Gill A, Robinson B, Learoyd D, et al. Increasing incidence of thyroid cancer is due to increased pathologic detection. *Surgery* 2008; 144:1038-43.

Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 1989;63:908-10.

Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004;351:1764-71.

Hegedus L. The thyroid nodule. *N Engl J Med*. 2004;351:1764-71.

Hellevik A.I, B.O. Asvold, T. Bjoro, P.R. Romundstad, T.I. Nilsen, L.J. Vatten, Thyroid function and cancer risk: a prospective population study, *Cancer Epi-demiol. Biomarkers Prev.* 18 (2009) 570–574.

Horn-Ross PL, Morris JS, Lee M, West DW, Whittemore AS, McDougall IR, et al. Iodine and thyroid cancer risk among women in a multiethnic population: the Bay Area Thyroid Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:979-85.

How J, Tabah R. Explaining the increasing incidence of differentiated thyroid cancer. *CMAJ* 2007; 177:1383-4.

INCA. Instituto Nacional do Câncer (INCA). www2.inca.gov.br; 2009

Ishikawa T, Miwa M, Uchida K. Quantitation of thyroid peroxidase mRNA in peripheral blood for early detection of thyroid papillary carcinoma. *Thyroid*. 2006.

Juha Kononen et col. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 4, 844 - 847 (1998).

Kansakar E, Chang YJ, Mehrabi M, et al. Expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and vascular endothelial growth factor-A in thyroid cancer. *Am Surg.* 2009;75:785–789.

Kumar A, Klinge CM & Goldstein RE. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *International Journal of Oncology* 2010 36 1067-80.

Lee ML, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC & van Hasselt CA 2005 Induction of thyroid papillary carcinoma cell proliferation by estrogen is associated with an altered expression of Bcl-xL. *Cancer Journal* 11 113–121.

Leung YK, Lam HM, Wu S et al: Estrogen receptor beta2 and beta5 are associated with poor prognosis in prostate cancer, and promote cancer cell migration and invasion. *Endocr Relat Cancer*, 2010; 17: 675–89.

Levi, S. Franceschi, C. Gulie, E. Negri, C. La Vecchia, Female thyroid cancer: the role of reproductive and hormonal factors in Switzerland, *Oncology* 50 (1993)309–315.

Liua J., Guang Chena, Xian-Ying Menga, Zhong-Hui Liub, Su Dongc. 2014 Serum levels of sex hormones and expression of their receptors in thyroid tissue in female patients with various types of thyroid neoplasms. *Pathology – Research and Practice* 210 (2014) 830–835.

Maciel R. M. B, *Carcinoma Diferenciado da Tiróide (Papilífero e Folicular): Diagnóstico e Conduta*. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 42 nº 4 Agosto 1998.

Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RMB, Maciel LMZ, et al. Nódulos de tireóide e câncer diferenciado de tireóide: consenso brasileiro. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007;51(5):867-93.

Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E & Derwahl M 2001 Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 1072–1077.

Marcello, Marjory Alana. Marcadores de malignidade para nódulos de tireóide. *Dissertação de mestrado, UNICAMP, 2011*.

Matos PS, Ferreira AP, Ward LS. Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series. *Endocr Pathol*. 2006 Summer;17(2):165- 73.

Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1447–1463.

Nam-Goong IS, Kim HY, Gong G, Lee HK, Hong SJ, Kim WB, et al. Ultrasonography-guided fine-needle aspiration of thyroid incidentaloma: correlation with pathological findings. *Clin Endocrinol.* 2004;60(1):21-8.

Niccoli P, Wion-Barbot N, Caron P, Henry JF, de Micco C, Saint Andre JP, et al. Interest of routine measurement of serum calcitonin: study in a large series of thyroidectomized patients. The French Medullary Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:338-41.

Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JWA, Wiersinga W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(6):787-803.

Papi G, Corsello SM, Cioni K, Pizzini AM, Corrado S, Carapezzi C, et al. Value of routine measurement of serum calcitonin concentrations in patients with nodular thyroid disease: a multicenter study. *J Endocrinol Invest.* 2006;29:427-37.

Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):1941-6.

Preston-Martin S, Franceschi S, Ron E, Negri E. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? *Cancer Causes Control* 2003;14:787-9.

Rago T, Vitti P, Chiovato SM, Mazzeo S, DeLiperi A, Miccolo P, et al. Role of conventional ultrasonography and color flow-Doppler sonography in predicting malignancy in “cold” thyroid nodules. *Eur J Endocrinol.* 1998;138(1):41-6.

Ramos AM, Sales Ade O, Barbalho de Mello LE, Cirino de Andrade M, Pinto Paiva F, Ramos CC, et al. Absence of peritumoral fibrosis or inflammatory infiltrate may be related to clinical progression of papillary thyroid microcarcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2009 Dec;17(6):432-7.

Ron E, Kleinerman RA, Boice JD Jr, LiVolsi VA, Flannery JT 326 & Fraumeni JF Jr. A population-based case-control study of thyroid cancer. *Journal of National Cancer Institute* 1987 79 1-12.

Rosário P. W, Ward S.S, Carvalho G. A, Graf H, Maciel R. M. B, Maciel L. M. Z, Maia A. L, Vaisman M. Thyroid nodule and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2013;57/4.

Rossi RL, Majlis D, Rossi RM. Thyroid cancer. *Surg Clin North Am.* 2000;80:571-80.
Santin AP & Furlanetto TW. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *Journal of Thyroid Research* 2011 2011 875125.

Steemburgo T, Azevedo MJ, Martinez JA. [Gene-nutrient interaction and its association with obesity and diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009. Jul;53(5):497-508.

Tavangar SM, Monajemzadeh M, Larijani B, et al. Immunohistochemical study of oestrogen receptors in 351 human thyroid glands. *Singapore Med J.* 2007;48:744 –747.

Vaiman M, Olevson Y, Habler L, Eviatar E, Zehari S, Sandbank J & Kessler A. The estrogen receptors in the papillary carcinoma of the thyroid gland. *Oncology Research* 2010 18 537–540.

Vaiman M, Olevson Y, Sandbank J, Habler L, Zehavi S & Kessler A. Are estrogen receptors a detectable in normal and abnormal thyroid tissue? *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2010 267 1753–1757.

Vannucchi G, Simone De Leo, Perrino M., Rossi S, Tosi D, Cirello V, Colombo C, Bulfamante C, Vicentini L, Fugazzola L. Impact of estrogen and progesterone receptor expression on the clinical and molecular features of papillary thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology* (2015) 173, 29–36.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Ando S & Maggiolini M. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce

the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor 300 GPR30. *Molecular Pharmacology* 2006 70 1414-23.

Ward LS, Assumpção LVM. Thyroid cancer: prognostic factors and treatment. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(1):126-36.

Ward LS, Graf H. Câncer da tireóide: aumento na ocorrência da doença ou simplesmente na sua detecção. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52:1515-6.

WARD, Laura S., MARRONE, Marília., CAMARGO, Rosalinda Y., WATANABE, Tomoko., TINCANI, Alfio J., MATOS, Patricia S., ASSUMPCÃO, Lígia V.M., TOMIMORI, Eduardo., KULCSAR, Marco Aurélio., NUNES, Maria Tereza., NOGUEIRA, Célia R., KIMURA, Edna T. Câncer diferenciado da tireóide de baixo risco: revisão do estado atual da literatura e proposta de conduta. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo , v. 50, n. 3, p. 550-557, jun. 2006.

WHO & IARC. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponível em: <http://www-depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>.

Xhaard C, Rubino C, Clero E, Maillard S, Ren Y, Borson-Chazot F, Sassolas G, Schwartz C, Colonna M, Lacour B, Danzon A, Velten M, Buemi A, Bailly L, Marine Barjoan E, Schlumberger M, Orgiazzi J, Adjadj E, de Vathaire F. Menstrual and reproductive factors in the risk of differentiated thyroid carcinoma in young women in France: a population-based case-control study. *American Journal of Epidemiology* 2014 180 1007-17.

Yan M, Rayoo M, Takano EA; kConFab Investigators, Fox SB: Nuclear and cytoplasmic expressions of ERb1 and ERb2 are predictive of response to therapy and alters prognosis in familial breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, 2011; 126: 395–405

Yane K, Kitahori Y, Konishi N, Okaichi K, Ohnishi T, Miyahara H, Matsunaga T, Lin JC & Hiasa Y. Expression of the estrogen receptor in human thyroid neoplasms. *Cancer Letters* 1994 84 59–66.

Zeng Q, Chen G, Vlantis A, Tse G & van Hasselt C. The contributions of oestrogen receptor isoforms to the development of papillary and anaplastic thyroid carcinomas. *Journal of Pathology* 2008 214 425-33.

Zeng Q, Chen GG, Vlantis AC, et al. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway. *Cell Prolif.* 2007;40:921–935.

Zhai QH, Ruebel K, Thompson GB & Lloyd RV 2003 Androgen receptor expression in C-cells and in medullary thyroid carcinoma. *Endocrine Pathology* 14 159–165.

7 ANEXOS

TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL- DPML/ UFC

Eu, Cristiane Cunha Frota, chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, fiel depositária dos arquivos de lâminas histológicas e blocos parafinados e da base de dados deste serviço, declaro que a aluna **Mayane Emanuela Melo Lopes Martins** está autorizada a realizar nesta instituição o projeto de pesquisa "**Avaliação imunohistoquímica da expressão de receptores estrogênicos alfa e beta e progesterona em carcinoma diferenciado de tireóide.**" sob a orientação do pesquisador **Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins**, cujo objetivo geral é "**Avaliar a expressão de Receptores Estrogênicos alfa e beta e Receptores de Progesterona em Câncer Diferenciado de Tireóide e neoplasia benigna de tireóide. Avaliar a relação da expressão dos RE alfa e beta e RP em CDT e o prognóstico da doença, em amostras de arquivo do Serviço de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML-UFC).**" Ressalto que estou ciente de que serão garantidos os direitos, dentre outros, assegurados pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde de:

- 1) Garantia da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos outros.
- 2) Que não haverá riscos para o sujeito da pesquisa.
- 3) Emprego dos dados somente para fins previstos nessa pesquisa.
- 4) Retorno dos benefícios obtidos através deste estudo para as pessoas e para a comunidade onde o mesmo foi realizado.
- 5) Os resultados da pesquisa serão divulgados em revistas científicas.

Informo, ainda, que a pesquisa somente será iniciada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio para garantir a todos os envolvidos os referenciais básicos da bioética, isto é, autonomia, não maleficência, beneficência e justiça.

Fortaleza, 11 de julho de 2014


Prof. Dra Cristiane Cunha Frota

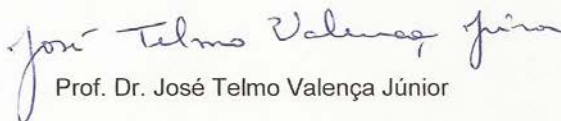
Chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal

Universidade Federal do Ceará

10- TERMO DE AUTORIZAÇÃO DO MÉDICO RESPONSÁVEL PELO SETOR ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA.

Eu, **Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior**, chefe do setor de biópsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC), conheço o protocolo de pesquisa intitulado: **Avaliação imunohistoquímica da expressão de receptores estrogênicos α e β , e de progesterona no carcinoma diferenciado de tireóide**, conheço seus objetivos e a metodologia que será desenvolvida e autorizo sua realização, estando ciente de que o pesquisador não irá interferir no fluxo normal deste serviço.

Fortaleza, 11 de julho de 2014


Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior

Chefe do setor de biópsia do DPML/UFC

Caso	Idade	Sexo	Classificação	Variação	Medida	Multicentricidade	Adenoma	Hashimoto	Invasão capsular	Bócio	Invasão linfática	RP	RE
1	38	F	1	1	1,8	2	1	1	1	1	1	1	1
2	69	F	1	3	8	2	2	2	1	2	1	1	1
3	52	F	1	1	x	2	2	2	2	2	2	1	1
4	37	F	1	2	2,5	2	1	2	1	2	1	2	3
5	37	M	1	1	3,5	2	2	2	1	1	1	1	1
6	50	F	1	4	0,4	2	2	2	2	2	2	2	2
7	58	F	1	2	1,4	2	1	2	2	2	2	4	2
8	85	F	1	3	2	2	2	2	1	2	2	1	1
9	7	F	1	3	1,9	1	2	2	1	2	1	4	1
10	25	F	1	2	2,5	2	2	2	2	2	1	1	1
11	46	F	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	2
12	52	F	1	4	0,4	1	2	1	2	1	2	1	1
13	36	F	1	4	0,3	2	2	2	2	2	2	3	1
14	78	F	1	2	1,5	2	1	1	2	1	2	2	2
15	41	F	1	2	5	2	2	2	2	2	2	1	1
16	51	M	1	2	3,5	2	2	2	2	2	2	2	1
17	17	M	1	3	4,5	2	2	2	1	2	1	2	1
18	56	F	1	3	2,2	2	2	2	1	1	1	3	2
19	56	F	1	2	1,8	2	2	2	1	1	1	2	1
20	44	M	1	1	2,5	2	2	2	2	2	2	2	4
21	44	M	1	4	0,8	1	2	1	2	2	1	3	3
22	50	F	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1
23	33	F	1	4	0,4	2	2	2	2	2	2	1	1
4 A	37	F	1	4	0,4	2	2	2	2	2	1	1	1
4 B	37	F	2	2	4,5	2	2	2	2	2	1	3	3
25	71	F	1	4	0,7	2	2	1	2	2	2	1	1
26	46	F	1	1	3,7	1	2	2	1	2	1	1	1
27	48	F	1	4	0,6	2	2	1	2	2	2	1	1
28	30	F	1	2	1,7	1	1	2	2	1	1	1	1
29	42	F	1	4	0,7	2	1	2	2	1	2	1	1
30	55	F	1	2	3	1	1	1	1	2	1	1	1
31	38	F	1	3	1,5	2	1	2	2	1	2	1	1
32	49	F	1	1	1,3	2	2	1	2	1	2	1	2
33	78	M	1	4	0,8	2	2	2	2	1	2	2	2
34	56	F	1	1	1,7	1	1	2	2	1	2	1	2
35	38	F	1	3	2	1	2	2	2	2	2	1	2
36	20	M	1	1	2,3	1	2	2	2	2	2	1	1
7 A	78	F	2	1	3,5	1	2	2	2	2	2	1	1
7 B	78	F	1	2	1,3	1	2	2	2	2	2	1	1
38	59	F	1	2	1,3	1	2	2	2	2	2	3	3
39	53	F	1	1	3	2	2	2	2	1	1	1	1
40	47	F	1	2	1,7	2	1	2	2	1	2	2	1

41	51	F	1	2	3,9	1	2	1	1	1	2	1	2
42	32	F	1	1	3	1	2	1	2	2	2	3	1
43	58	F	1	4	0,8	2	2	2	2	1	2	1	1
44	47	F	1	1	3	1	1	2	1	2	1	1	1
45	75	F	1	2	5,5	1	2	2	2	2	2	2	1
46	31	F	1	4	0,7	1	2	2	2	1	2	1	2
47	50	F	1	4	1	1	2	2	2	1	2	2	2
48	38	F	1	2	4,8	2	2	1	2	1	2	2	1
49	49	F	1	2	1,4	2	2	2	2	2	1	1	1
50	72	F	1	1	2,7	1	1	1	2	1	2	1	1
51	63	F	1	4	0,5	2	2	2	2	1	2	1	3
52	18	M	1	1	1,7	1	2	1	1	2	1	2	2
53	61	F	1	4	0,4	1	2	2	2	1	2	1	2
54	55	F	1	4	0,6	1	2	2	2	1	1	1	1
5 A	53	F	2	1	3,8	1	2	2	2	2	2	1	1
5 B	53	F	1	1	1,2	1	2	2	2	2	2	1	1
56	70	M	1	4	0,7	2	1	2	2	2	2	1	2
57	42	F	1	1	x	2	2	1	2	2	2	2	4
58	46	F	1	2	1,1	1	2	1	1	2	2	4	4
59	55	F	1	2	2,2	1	2	2	2	2	1	4	4
60	40	F	1	2	1,2	1	1	1	1	2	2	4	1
61	44	F	1	3	2,5	2	1	2	1	2	1	4	4
62	60	F	1	1	1,3	1	2	2	2	2	2	3	1
63	63	F	1	4	0,9	2	1	1	2	1	2	2	2
64	60	F	1	4	0,8	2	1	1	2	1	2	1	1
65	54	F	1	4	1	2	1	2	2	2	2	2	1
66	50	F	1	2	4	2	2	2	1	2	2	3	2
67	64	M	1	4	0,5	1	2	2	2	2	2	1	1
68	79	F	1	4	1	2	2	1	2	1	2	2	1
69	48	F	1	4	0,8	2	2	2	2	1	2	2	2
70	21	F	1	1	1,2	2	2	1	2	2	2	1	1
71	28	F	1	4	0,8	2	2	2	2	1	1	2	1
72	43	F	1	2	1,3	1	2	2	2	2	2	2	2
73	27	F	1	1	1,8	1	2	2	2	2	1	1	1
74	48	F	1	4	0,5	2	2	2	2	1	2	2	3
75	59	F	1	3	5	2	2	2	2	1	1	2	2
76	49	F	1	2	1,7	1	2	2	2	1	2	1	1
77	32	F	2	1	4,5	2	2	2	1	1	2	1	1
78	49	F	1	4	0,8	2	1	2	2	1	2	3	2
79	50	F	1	3	1,8	2	2	1	2	2	2	1	1
80	61	F	1	1	1,4	2	2	2	1	2	1	1	1
81	58	F	1	2	1,4	2	1	2	1	1	2	4	4

