ELAINE STABENOW

Predição do risco de metástase do carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide pela quantificação digital da imunoexpressão da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Tavares

São Paulo

2006

Dedico este trabalho aos meus pais, Sônia Marina e Erlo; meu irmão, Emerson e ao meu esposo João Carlos.

AGRADECIMENTOS

Por ser esta tese dedicada ao Dr. João Carlos das Neves Pereira, meu esposo, fica manifesto o reconhecimento à paciência e ao carinho com que ele sempre me incentivou e ativamente colaborou durante todo o trabalho. Na discussão do planejamento, foi quem me sugeriu correlacionar a imunoexpressão da galectina-3 com apoptose, proliferação celular e angiogênese, bem como a aplicação do modelo de predição.

Registro meu respeitoso agradecimento aos pacientes, único sentido da ciência médica. Com os dados que proporcionaram, eles efetivamente permitiram o êxito da pesquisa. Em uma aplicação do preceito de amar ao próximo, transformaram seu próprio sofrimento em esperança de aperfeiçoar a terapêutica dos que vierem a ter doença semelhante.

O trabalho foi consequência não só da evolução e aperfeiçoamento pessoal da autora, como também do domínio que obtive das respectivas técnicas de pesquisa. Nesse processo, pessoas e instituições envolvidas com uma ou outra dessas áreas, tornaram-se tão numerosas que as omissões que houver neste prefácio são inevitáveis, ainda que involuntárias.

Registro, desde já, minha gratidão a professores e colegas, técnicos e funcionários, amigos e familiares, participantes diretos ou indiretos no trabalho.

Sou particularmente grata ao Professor Dr. Marcos Roberto Tavares, pelas primeiras discussões que tivemos sobre a indicação do esvaziamento cervical em casos de carcinoma tireóideo e que vieram a gerar a idéia da atual pesquisa. Bem antes de sua importante orientação docente, quero recordar afetosamente de sua amizade e de uma pessoa da família Tavares que também influenciou em minha formação, em etapas bem mais iniciais, a dedicada professora Leny Tavares do Carmo.

Nesse sentido, minha gratidão estende-se à notável Professora Dra. Angelita Habr-Gama, cirurgiã emérita e pesquisadora consagrada em todo o mundo, exemplo para gerações de jovens médicos, e que constituiu a inspiração para a minha escolha de uma especialidade cirúrgica.

O ilustre Professor Associado, Dr. Anói Castro Cordeiro, prezado mestre, orientou-me a respeito de comunicação científica em geral e nesta tese participou desde o projeto à revisão final. Exemplar Professor de Cirurgia, ensinou-me grande parte da técnica que ora emprego. A amizade reconfortante do emérito cirurgião e sua esposa, D. Anna Maria, teve muita importância na minha evolução como médica.

Ao Prof. Titular Dr. Alberto Rossetti Ferraz agradeço, como o responsável pela elevada tarefa de gerir um Serviço Universitário, supervisionar a atenção assistencial e ao mesmo tempo estimular a pesquisa e atividade educacional nesta Unidade da USP, atividades que contribuíram enormemente para minha formação.

No âmbito técnico científico sou grata à Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, consumada patologista e verdadeira co-orientadora. A ela devo bem mais do que o competente respaldo técnico, ensinou-me desde a interpretação da imunohistoquímica até os procedimentos para a publicação de artigos. Sem ela, este trabalho não seria concluído, desenvolvido, ou mesmo começado.

Ao Dr. Alexandre Muxfeldt Ab'Saber, patologista e pesquisador de experiência internacional, agradeço a permanente disponibilidade para a análise dos blocos e aperfeiçoamento das contagens em imagens histológicas. Ao Dr. Edwin Roger Parra Cuentas, experiente patologista, exemplo de solidariedade sem fronteiras, por ter colaborado de forma exemplar na solução de várias dúvidas no decorrer desta pesquisa.

Sou grata às senhoras Sandra de Moraes Fernezlían, Esmeralda Miristene Eher, Ângela Batista dos Santos e Ana Lucia Garippo, profissionais de enorme competência e dedicação na tarefa de confeccionar e corar as lâminas estudadas.

Em particular agradeço ao acadêmico da Faculdade de Medicina do ABC, Sr. Leandro Luongo de Matos, por seu auxílio dedicado e amigo, pelas sugestões técnicas, principalmente na aplicação da análise digital da imunoeexpressão dos marcadores empregados.

A Profa.Dra. Aparecida da Silva Pinhal do Laboratório de Medicina Molecular da Escola Paulista de Medicina, Titular de Bioquímica da Fac. Medicina do ABC, onde gentilmente disponibilizou, para o estudo, o equipamento de captura digital de imagem. Sou-lhe grata pela orientação quanto à análise digital.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, pesquisador de projeção internacional, sou grata pelo incentivo no estudo das múltiplas funções da galectina-3 e auxílio na interpretação do significado biológico da imunoeexpressão encontrada.

À amável Sra. Maria Graciela Luongo de Matos, mestranda em logística pela Faculdade Getúlio Vargas, pelo decisivo auxílio na contabilização dos resultados e análise estatística, sem esquecer o extraordinário carinho que recebi de toda sua distinta e exemplar família.

Agradeço às acadêmicas de Medicina, Srtas. Carla Tubertini e Damila Truffeli, que de inúmeras formas me auxiliaram na organização dos dados clínicos e localização dos doentes, inextinguíveis na arte de harmonizar aprendizado médico, trabalho assistencial e pesquisa científica. Agradeço também aos colegas Drs. Flávio Viana e Renato Akira pelo levantamento inicial dos registros dos doentes, Drs. Caio Plopper e Felipe Brasileiro pela ajuda na constituição da casuística e amigável incentivo.

À secretária Sra. Márcia Corradini, do Instituto do Coração, que se dispôs a auxiliar no levantamento bibliográfico.

Sou também muito grata ao criterioso Dr. Pedro Michaluart Jr, exemplo de harmonia entre as virtudes de cirurgião, cientista e educador, que o tornam um modelo que muito influenciou minhas convicções. De modo proveitoso, debateu pontos técnicos fundamentais para este trabalho.

Devo um agradecimento especial ao Prof. Dr. Paulo Campos Carneiro, renomado patologista, pelos fundamentos conceituais e importantíssimas discussões que muito contribuíram para a conclusão do trabalho.

Mais professores ainda me concederam sua ajuda. Assinalo o Prof. Dr. Vergílius J. Furtado de Araújo Filho e Prof. Dr. Cláudio Roberto Cernea, estímulos da massa crítica científica, que muito me incentivaram durante a Residência, bem como os professores associados do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMUSP, os Professores Gilberto de Britto e Silva Filho, Lenine Brandão, e Luiz Roberto Medina dos Santos.

Aos cirurgiões Fabio Luiz de Menezes Montenegro, Sérgio Samir Arap e Celso U. Moretti Friguglietti, doutores em Medicina, senhores de fina técnica e

elevado espírito ético, que debateram proveitosamente importantes pontos nas fases iniciais da pesquisa e aos Médicos assistentes Drs Luis Roberto P. Magalhães, Sunao Nishio e Marcelo Durazzo, que muito ajudaram meu treinamento em clínica e cirurgia no HC-FMUSP.

Destaco nesse ponto a importância do incentivo constante do Prof. Dr. Venâncio A. Ferreira Alves e à Dra. Inês Vieira de Castro pela discussão e orientação antes da minha matrícula na Pós-Graduação.

O Dr. Jose Ribas Milanez de Campos, cirurgião torácico, que muito colaborou com a forma dos manuscritos iniciais.

Merece minha admiração toda a equipe formada por dedicadas fonoaudiólogas, psicólogas, enfermeiras e técnicos do HC-FMUSP.

Devo meu reconhecimento à equipe do cirurgião Dr. Luiz Antonio Della Negra, diretor do Hospital São Caetano, pela sólida amizade com que me assistiram nos meus primeiros passos cirúrgicos fora do HC-FMUSP.

Sou especialmente grata ao Dr. Marcelo Mester que, através de acordo franco-brasileiro, possibilitou meu estágio na *Assistance Publique Hôpitaux de Paris*, onde pude aprofundar alguns aspectos de minha pesquisa. Lá, a gentilíssima e eficiente Madame Deal, responsável pelos médicos residentes, tornou praticável o intercâmbio, ao desvencilhar dificuldades administrativas.

Na França, merecem sinceros agradecimentos o Prof. Daniel Brasnu, Chefe do Serviço de Cirurgia de Cabeça e pescoço do *Hôpital Europeen Georges Pompidou* de Paris, e o Prof. Olivier Laccourreye, que permitiram ampliar minha experiência em operações da especialidade. Generosamente sugeriram outras pesquisas com o objetivo de avaliar a extensão do esvaziamento cervical em portadores de carcinoma tireóideo, com base no transcriptoma.

Agradeço à sempre amável Dra. Eva Behm, *Chef de Clinique* do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do *Hôpital Europeen Georges Pompidou*, que com seu vivo interesse no conagração científico franco-brasileiro, sugeriu a aplicação do método aos doentes do seu Hospital.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, responsável pelo Programa de Pós-graduação do Instituto do Coração, devo minha iniciação no campo da bioestatística. Pacientemente orientou-me quanto ao modelo de predição de eventos binários em estudo de caso-controle.

O Professor Armando Bartolazzi, que criou o grupo europeu para o estudo da galectina-3 e, de Roma, proporcionou-me um canal de discussões sobre sua aplicação prática.

Assinalo, ainda, o estímulo recebido da Profa. Xiao-Feng Sun, do Departamento de Oncologia do Instituto de Cirurgia da Universidade de Linköping, Suécia, ao tomar conhecimento de nossas comunicações em Congresso e sugerir trabalhos conjuntos.

Por fim, mas ainda sem completar a lista devida, agradeço a Direção da CAPES, pela oportunidade de adquirir o programa *ImageLab*, parte do material para captura digital das imagens, reagentes e anticorpos, bem como de viajar ao Congresso Europeu de Oncologia para apresentação de trabalhos, direta ou indiretamente relacionados com a tese.

**“...Invoca-me, e eu te atenderei e te anunciarei coisas
grandes e segredos que tu ignoras.”**

(Jeremias 33:3)

Esta tese obedece:

As recomendações do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, segundo o Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias, elaborado por Cunha AC, Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

As normas de referências bibliográficas adaptadas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos da *List of Journals Indexed in the Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1. O carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide	8
2.2. Imunoexpressão de marcadores biológicos no CBDT	14
2.3. Galectina-3	15
2.3.1. Estrutura e função.....	15
2.3.2. Proliferação celular	23
2.3.3. Apoptose.....	28
2.3.4. Angiogênese.....	31
3. OBJETIVO.....	33
4. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	36
4.1. Pesquisa dos dados da casuística e desenho do estudo.....	37
4.2. Avaliação anátomo-patológica.....	41
4.3. Análise imunohistoquímica.....	42
4.3.1. Técnica de coloração.....	42
4.3.2. Quantificação digital da imunoexpressão	46
4.3.2.1. Cálculo do índice de positividade (IP)	47
4.3.2.2. Cálculo da intensidade de expressão (ItE).....	49
4.3.2.3. Cálculo do índice de expressão (IE)	52
4.3.2.4. Cálculo da densidade de microvasos (DMV)	53
4.4. Análise estatística.....	53
4.4.1. Predição de risco individual	54
5. RESULTADOS	56
5.1. Resultados descritivos relativos à casuística	57
5.1.1. Características clínicas pré-operatórias.....	58
5.1.2. Tratamento cirúrgico.....	60
5.1.3. Características clínicas pós-operatórias	61
5.1.4. Características anátomo-patológicas.....	62
5.1.5. Estadiamento	63
5.1.5.1. Total de metástase.....	65
5.1.6. Classificação AMES.....	65
5.1.7. Seguimento e sobrevivência.....	65
5.2. Comparação das características entre os grupos caso e controle.....	69
5.2.1. Características clínicas	69
5.2.2. Tratamento cirúrgico.....	70

5.2.3. Características anátomo-patológicas.....	71
5.2.4. Classificação AMES.....	72
5.2.5. Seguimento e sobrevivência.....	73
5.3. Resultados relativos à imunoexpressão dos marcadores biológicos	75
5.3.1. Resultados descritivos dos marcadores	75
5.3.1.1. Galectina-3 no tecido benigno.....	75
5.3.1.2. Galectina-3 no tecido maligno.....	75
5.3.1.3. Ki-67, caspase-3 e CD-34 no tecido maligno.....	78
5.3.2. Marcadores em relação à presença de metástase.....	78
5.3.2.1. Galectina-3.....	78
5.3.2.2. Ki-67, caspase-3 e CD-34	84
5.3.2.3. Predição do risco individual de metástase.....	85
5.3.2.4. Correlação entre marcadores.....	87
5.3.3. Galectina-3 e outras características anátomo-patológicas	88
5.3.4. Galectina-3 e sobrevivência.....	94
6. DISCUSSÃO	97
6.1. Discussão sobre o método	98
6.1.1. Quantificação digital da imunoexpressão	101
6.1.2. Limitações do estudo	102
6.2. Resultados descritivos relativos à casuística	108
6.3. Comparação das características entre os grupos caso e controle.....	110
6.4. Resultados relativos à imunoexpressão dos marcadores biológicos	114
6.4.1. Galectina-3 no tecido benigno	114
6.4.2. Galectina-3 no tireócito maligno	120
6.4.2.1. Imunoexpressão nucleolar	121
6.4.2.2. Imunoexpressão nucleoplasmática	124
6.4.2.3. Imunoexpressão citoplasmática.....	126
6.4.3. Marcadores em relação à presença de metástase.....	130
6.4.3.1. Galectina-3 e predição do risco de metástase	130
6.4.3.2. Correlação entre marcadores.....	133
6.4.4. Galectina-3 e outras características anátomo-patológicas.....	137
6.4.5. Galectina-3 e sobrevivência.....	140
6.5. Aplicação clínico-cirúrgica dos resultados.....	141
6.6. Perspectivas	142
7. CONCLUSÕES	145
8. ANEXOS.....	148
8.1. ANEXO A.....	149
8.2. ANEXO B.....	152
8.3. ANEXO C.....	158
8.4. ANEXO D.....	160
9. REFERÊNCIAS	166
Apêndice	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFIP	<i>Armed Force Institute of Pathology</i>
AgNOR	impregnação argêntica das regiões organizadoras de nucléolos
AMES	<i>age, metastasis, extension, size</i>
ANOVA	análise de variância
Bcl-2	antígeno marcador de células de linfoma B
BSA	soro albumina bovina
Cap.	capítulo
CBDT	carcinoma bem diferenciado da tireóide
CD-34	catepsina D-34
CGA	campos de grande aumento
DAB	3-3'-diaminobenzamida
DMV	densidade de microvasos
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOc	densidade óptica da cor castanha
DOf	densidade óptica do fundo
DP	desvio padrão
εBP	<i>IgE binding protein</i>
ed.	edição
et al.	e colaboradores
Fase S	fase de síntese do ciclo celular
Fas	antígeno de superfície celular indutor da apoptose
Fc	fragmento cristalino da cadeia pesada da imunoglobulina
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
HE	hematoxilina-eosina

HPF	<i>high power field</i>
HTLV	vírus do linfoma T humano
IC 95%	intervalo de confiança da média em 95%
IE	índice de expressão
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IP	índice de positividade
ItE	intensidade de expressão
LIM	laboratório de investigação médica
LSAB	<i>labeled streptavidin-biotin</i>
Ki-67	proteína nuclear Ki-67
M	metástase hematogênica
MAC-2	antígeno de superfície de macrófago tipo 2
MIBI	2-metoxi-isobutil-isonitrila
N	linfonodos regionais
NM	linfonodos regionais e metástase hematogênica
OMS / WHO	Organização Mundial da Saúde
p53	proteína nuclear p53
p.	página
PAAF	punção aspirativa por agulha fina
PBS	tampão fosfato de sódio
PCI	pesquisa de corpo inteiro
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PML	corpúsculos nucleares relacionados à leucemia mielóide
RGB	<i>red, green, blue</i>
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro

RNAr	ácido ribonucléico ribossômico
RNAt	ácido ribonucléico transportador
SE	erro padrão
SMN	proteína da sobrevivência do neurônio motor
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
ssDNA	fita simples de ácido desoxirribonucléico
T	tumor primário
T3	triiodotironina sérica
T4 livre	tetraiodotironina sérica livre
TGB	tireoglobulina sérica
TPO	tireoperoxidase
TSH	hormônio tíreo-estimulante
T[H3]	timidina tritiada por hidrogênio marcado
TNF	fator de necrose tumoral
TNM	sistema internacional de classificação dos tumores malignos
TRAIL	ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TTF-1	fator de transcrição tireóideo-1
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

β	coeficiente de magnitude de risco
Exp (β)	exponencial neperiano de β
kDa	quilo-dawton
$\pm$	mais ou menos
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
μm^2	micrômetro quadrado
mcU/ml	microunidades por mililitro
mCi	milicuries
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mm^2	milímetro quadrado
n	frequência
ng/dl	nanograma por decilitro
ng/ml	nanograma por mililitro
p	probabilidade de erro alfa
%	porcentagem
Σ	somatória
uo/ μm^2	unidade óptica por micrômetro quadrado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição tecidual da galectina-3.....	18
Tabela 2 – Principais contra-receptores biológicos para galectina-3.....	19
Tabela 3 – Funções atribuídas à galectina-3.	20
Tabela 4 – Média, valores mínimo e máximo da dosagem laboratorial do T4 livre, TSH e tireoglobulina sérica (TGB) no período pré-operatório.	59
Tabela 5 – Sinopse da frequência das características anátomo-patológicas associadas ao CBDT.	63
Tabela 6 – Comparação da frequência dos subtipos histológicos do carcinoma papilífero entre os grupos de doentes com e sem metástase.	71
Tabela 7 – Comparação da frequência das características anátomo-patológicas associadas ao CBDT entre os grupos com e sem metástase.	72
Tabela 8 – Estratificação em grupos de risco segundo a classificação AMES dos doentes do grupo sem metástase e do grupo com metástase linfática.....	73
Tabela 9 – Média, valor mínimo e máximo da expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3 no CBDT, segundo os compartimentos do tireócito maligno.	76
Tabela 10 – Média, valor mínimo e máximo da imunoexpressão do Ki-67, caspase-3, densidade de microvasos e número de casos que não apresentaram marcação.....	78
Tabela 11 – Média, valor mínimo e máximo dos índices de expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3 no grupo de doentes sem metástase, segundo os compartimentos do tireócito maligno.	79
Tabela 12 – Média, valor mínimo e máximo dos índices de expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3 no grupo de doentes com metástase, linfática ou hematogênica, segundo os compartimentos do tireócito maligno.	79
Tabela 13 – Comparação da média dos índices de imunoexpressão do Ki-67, caspase-3 e densidade de microvasos entre os grupos de doentes sem e com metástase, linfática ou hematogênica.	84
Tabela 14 – Fatores preditivos do risco da ocorrência de metástase (linfática ou hematogênica) no CBDT à análise multivariada por regressão logística.....	85
Tabela 15 – Fatores preditivos do risco da ocorrência de metástase linfática no CBDT à análise multivariada por regressão logística.	86
Tabela 16 – Comparação entre as médias e dos índices de imunoexpressão da galectina-3 segundo o tipo histológico do CBDT.	88
Tabela 17 – Comparação da média dos índices de imunoexpressão da galectina-3 entre os carcinomas únicos e múltiplos.	90

Tabela 18 – Comparação da média dos índices de imunexpressão da galectina-3 entre os carcinomas minimamente invasivos e os demais.	91
Tabela 19 – Comparação da média dos índices de imunexpressão da galectina-3 entre os carcinomas com e sem extensão extratireóidea.	91
Tabela 20 – Comparação entre as médias dos índices de imunexpressão da galectina-3 segundo a evolução para óbito correlacionado.....	94
Tabela 21 – Fatores preditivos do risco de morte correlacionada ao CBDT à análise multivariada por regressão de Cox.....	94
Tabela 22 – Comparação entre as médias dos índices de imunexpressão da galectina-3 segundo a presença de recidiva ou persistência do CBDT.	95
Tabela 23 – Fator preditivo do risco da ocorrência de recidiva ou persistência do CBDT à análise multivariada por regressão de Cox.....	95
Tabela A1 – Classificação TNM do carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide.	150
Tabela A2 – Estadiamento do carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide, com base no TNM.	150
Tabela A3 – Índice prognóstico AMES.....	151
Tabela A4 – Grupos de risco, determinados segundo o índice prognóstico AMES.....	151
Tabela A5 – Dados clínicos pré-operatórios dos doentes incluídos no estudo.....	152
Tabela A6 – Dados do tratamento cirúrgico, clínicos pós-operatórios e seguimento dos doentes incluídos no estudo.....	154
Tabela A7 – Características anátomo-patológicas dos carcinomas, estadiamento TNM e classificação AMES dos doentes incluídos no estudo.	156
Tabela A8 – Valores obtidos pela quantificação imunohistoquímica dos marcadores estudados em cada caso.	158
Tabela A9 – Comparação das características clínicas entre o grupo de doentes sem metástase (controle) e o grupo de doentes com metástase linfática ou hematogênica (caso).	160
Tabela A10 – Correlação dos índices de expressão citoplasmática da galectina-3 entre si e com os índices de positividade nucleolar e nucleoplasmática.	163
Tabela A11 – Correlação dos índices de expressão imunohistoquímica dos marcadores entre si no grupo de doentes sem metástase.....	164
Tabela A12 – Correlação dos índices de expressão imunohistoquímica dos marcadores entre si no grupo de doentes com metástase.....	165
Tabela AP1 – Análise do tempo de sobrevivência global em 60 meses	Apêndice D
Tabela AP2 – Análise do tempo de sobrevivência livre de doença em 60 meses	Apêndice E

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura da proteína galectina-3, evidenciando as porções amino e carbóxi-terminal, ligadas aos respectivos contra-receptores.....	17
Figura 2 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para galectina-3 em aumento de 400x. Nota-se conglomerado de macrófagos xantomatosos de colorido castanho no citoplasma, representativos do controle interno positivo.	45
Figura 3 – Fotomicrografia de lâminas coradas por imunohistoquímica em aumento de 400x. (A) Expressão da galectina-3 no nucléolo (seta em vermelho), nucleoplasma (seta em verde) e citoplasma (seta em preto) dos tireócitos malignos; (B) expressão do endoteliócito para CD-34; (C) expressão citoplasmática da caspase-3; (D) expressão nuclear do Ki-67.....	46
Figura 4 – Demonstração do uso do ImageLab® na identificação manual de células positivas (pontos brancos) e negativas (pontos pretos) e sua concomitante contagem automática (seta) para o cálculo do IP.	49
Figura 5 – Demonstração do uso do ImageLab®. (A) Determinação manual das 12 áreas de citoplasma corado (quadrados em vermelho); (B) planilha de resultados onde a seta indica a média do RGB pela área total delimitada.....	51
Figura 6 – Demonstração do uso do ImageLab® na determinação manual da área de ausência de tecido (quadrado em vermelho) e o cálculo de sua densidade (seta).	52
Figura 7 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência em 60 meses.....	67
Figura 8 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença em 60 meses.	68
Figura 9 – Comparação das curvas de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença em 60 meses entre os grupos com e sem metástase no momento do tratamento operatório.	74
Figura 10 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para galectina-3 em aumento de 400x. Nota-se o colorido castanho no citoplasma, nucleoplasma e nucléolo dos tireócitos malignos. Observa-se marcação específica das zonas fibrilar densa e granulosa dos nucléolos (setas vermelhas).....	77
Figura 11 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão citoplasmática da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase..	80
Figura 12 – Gráfico da comparação da média dos índices de positividade nucleolar da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase.....	80
Figura 13 – Gráfico da comparação da média dos índices de positividade nucleoplasmática da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase.	81

Figura 14 – Frequência de casos positivos para galectina-3 na região nucleolar nos grupos com e sem metástase (linfática ou hematogênica).....	82
Figura 15 – Gráfico da comparação da média dos índices de positividade nucleolar da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase exclusivamente linfática.....	83
Figura 16 – Frequência de casos positivos para galectina-3 na região nucleolar nos grupos com e sem metástase exclusivamente linfática.	83
Figura 17 – Gráfico que representa o risco da ocorrência de metástase linfática em função do índice de positividade nucleolar da galectina-3.	86
Figura 18 – Gráfico da comparação entre as médias dos índices de positividade nucleoplasmática da galectina-3 segundo o subtipo histológico do carcinoma papilífero..	89
Figura 19 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão citoplasmática da galectina-3 entre os grupos de carcinomas únicos e múltiplos..	90
Figura 20 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão citoplasmática da galectina-3 entre os grupos de carcinomas com e sem extensão extratireóidea.....	92
Figura 21 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão citoplasmática da galectina-3 entre os grupos de carcinomas com e sem invasão linfática..	93
Figura A 1 – Número de doentes dos grupos com e sem metástase (linfática ou hematogênica) em função do índice de positividade nucleolar da galectina-3.	162
Quadro A1 – Classificação AFIP dos subtipos de carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide.	149
Quadro AP1 – Classificação Histológica da Organização Mundial da Saúde de dos Tumores da Glândula Tireóide.....	Apêndice A

RESUMO

Stabenow E. *Predição do risco de metástase do carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide pela quantificação digital da imunexpressão da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

INTRODUÇÃO: Os carcinomas papilífero e folicular são neoplasias malignas primárias da glândula tireóide. Em conjunto, recebem o nome de carcinoma bem diferenciado. Determinar o risco individual da ocorrência de metástase nesses casos auxilia na seleção da terapêutica que é atualmente baseada na classificação de acordo com fatores prognósticos, aos quais pode ser associada a pesquisa de marcadores biológicos. Dentre eles, destaca-se a galectina-3, cujas funções exercidas nos compartimentos celulares foram descritas em uma variedade de neoplasias. Entretanto, seu papel no carcinoma tireóideo permanece controverso. Com o intuito de investigar se a galectina-3 pode auxiliar na predição do risco individual da ocorrência de metástase e se está associada aos critérios de malignidade do carcinoma bem diferenciado, a presente pesquisa objetivou verificar as seguintes hipóteses: 1) se há diferença da imunexpressão da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno entre os doentes com e sem metástase e se é possível prever o risco de metástase em função da quantificação digital desse marcador; 2) se há diferença da imunexpressão da galectina-3 entre o tecido tireóideo maligno e o não neoplásico; conforme a presença de invasão tecidual; e conforme a sobrevivência; 3) se há indício do envolvimento da galectina-3 com apoptose, indução da proliferação celular e angiogênese. **MÉTODO:** Trata-se de estudo retrospectivo de caso-controle que envolveu 109 doentes operados por carcinoma bem diferenciado da tireóide e seguidos por mais de cinco anos, distribuídos em dois grupos equivalentes: com e sem metástase. Foram feitas coleta de dados clínicos, avaliação anátomo-patológica e análise imunohistoquímica digital dos biomarcadores galectina-3, Ki-67, caspase-3 e CD-34. **RESULTADOS:** 1) A média do índice de positividade nucleolar da galectina-3 foi maior no grupo de doentes com metástase linfática cervical ($1,78 \pm 0,41$ nucléolos/CGA contra $0,35 \pm 0,13$, $p=0,004$). A expressão nucleolar da galectina-3 apresentou especificidade de 75% para identificação da ocorrência de metástase e foi fator independente associado à ocorrência metástase linfática ($p=0,01$). A equação logística obtida permitiu calcular o risco individual de desenvolvimento de metástase linfática cervical que é próximo a 100% quando a galectina-3 está imunexpressa em quatro ou mais nucléolos por campo microscópico de grande aumento. 2) não houve expressão da galectina-3 no tireócito não neoplásico; o índice de expressão citoplasmático foi fator independente associado à presença de invasão linfática ($p=0,013$) e a média desse índice foi maior nos casos com extensão extratireóidea ($52,7 \pm 3,9$ uo/ μm^2 contra $41,0 \pm 4,0$, $p=0,037$); não houve associação dos índices de imunexpressão da galectina-3 e sobrevivência; 3) no grupo de doentes com metástase, a expressão nucleoplasmática da galectina-3 correlacionou-se de forma positiva com o índice de positividade do Ki-67 e, nos dois grupos, a expressão citoplasmática com o índice de expressão da caspase-3. **CONCLUSÕES:** Foi possível prever o risco individual da ocorrência de metástase linfática cervical em função da quantificação digital da imunexpressão nucleolar da galectina-3. O presente estudo sugere que alta expressão citoplasmática está associada com algumas características de invasão local. Houve indícios do envolvimento da galectina-3 com indução da proliferação celular e apoptose no grupo de doentes com metástase.

Descritores: 1.Neoplasias da glândula tireóide 2.Carcinoma papilar 3.Adenocarcinoma folicular 4.Metástase neoplásica 5.Modelos logísticos 6.Marcadores biológicos de tumor 7.Galectina 3 8.Compartimento celular 9.Imunohistoquímica/método

SUMMARY

Stabenow E. *Prediction of metastasis risk in well-differentiated thyroid carcinoma based on digital quantification of galectin-3 immunoexpression in subcellular compartments of the malignant thyrocyte* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

INTRODUÇTTON: Papillary and follicular carcinomas are primary malignant neoplasias of the thyroid gland and are classified as well-differentiated carcinoma. In these cases, determination of individual risk of metastasis allows offering an adequate treatment. Nowadays therapy is chosen based on classification according to prognostic factors and biomarkers can be associated with them. Galectin-3 is one of these markers and has been thoroughly studied. A wide range of functions that it carries out in the subcellular compartments have been described in several neoplasms. However, its role in thyroid carcinomas remains controversial. In order to investigate if galectin-3 can be used to predict the individual risk of metastasis and if this marker is associated with malignant criteria of well-differentiated carcinoma, this study was proposed to verify the following hypotheses: 1) if galectin-3 immunostaining in subcellular compartments of the malignant thyrocyte is different when comparing patients with and without metastasis and if it is possible to predict the individual risk of metastasis based on digital quantification of the galectin-3 immunostaining; 2) if galectin-3 immunoexpression is different from malignant and benign thyroid tissue; according to tissue invasion and survival; 3) if there are indications that galectin-3 plays a role in apoptosis and cell proliferation or angiogenesis induction. **METHODS:** It was performed a retrospective case-control study involving 109 patients treated for well-differentiated thyroid carcinoma and followed up for more than five years. They were divided into two equivalent groups: with and without metastasis. The search of clinical data, morphological evaluation and digital immunohistochemical analysis with galectin-3, Ki-67, caspase-3 and CD-34 antibodies were done. **RESULTS:** 1) the average of the nucleolar galectin-3 positive index was higher in lymph node metastasis group (1.78 ± 0.41 nucleoli/HPF versus 0.35 ± 0.13 , $P=.004$). Nucleolar staining was an independent factor associated with lymph node metastasis ($P=.01$) and its specificity to identify metastasis was 75%. The logistic model allowed predicting the individual risk of cervical lymph node metastasis. It was almost 100% for carcinomas displaying more than four galectin-3 immunostained nucleoli by microscopic high power field. 2) There was no galectin-3 immunostaining in non-neoplastic thyrocyte; the cytoplasmic galectin-3 expression index was an independent factor associated with lymphatic invasion ($P=.013$) and these index average was higher in cases with extrathyroidal extension (52.7 ± 3.9 uo/ μm^2 versus 41.0 ± 4.0 , $P=.037$); there was no association of galectin-3 immunostaining indexes with survival; 3) in the metastasis group, there was positive correlation between nucleoplasmic staining of galectin-3 and Ki-67 positive index; there was positive correlation between cytoplasmic staining of galectin-3 and caspase-3 positive index in both groups. **CONCLUSION:** It was possible to predict the individual risk of cervical lymph node metastasis based on digital quantification of the nucleolar galectin-3 immunostaining. This study suggests that there is association of high cytoplasmic expression with local tissue invasion. In the metastasis group there were indications that galectin-3 plays a role in cell proliferation and apoptosis induction.

Keywords: 1.Thyroid neoplasms 2.Carcinoma, papillary 3.Adenocarcinoma, follicular 4.Neoplasm metastasis 5.Logistic models 6.Tumor markers, biological 7.Galectin 3 8.Cell compartmentation 9.Immunohistochemistry/methods

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os carcinomas papilífero e folicular são neoplasias epiteliais malignas primárias da glândula tireóide, derivadas das células foliculares, conforme a classificação histológica das neoplasias tireóideas adotada pela OMS¹. Em conjunto, recebem o nome de carcinoma bem diferenciado da tireóide (CBDT); razões clínicas e morfológicas justificam agregá-los².

Assim considerado, o CBDT é a segunda neoplasia mais comum da região da cabeça e pescoço e a primeira do sistema endócrino. Ocorre em 5 a 10 % dos portadores de nódulo tireóideo único e é responsável por 90% dos carcinomas primários da glândula tireóide^{1, 3-6}. Estudos epidemiológicos recentes demonstram progressivo aumento do número de diagnóstico do CBDT nas últimas décadas^{3, 7}.

Embora estejam bem estabelecidas as bases para o diagnóstico, classificação e escolha da terapêutica, controvérsias ainda existem, e esses critérios devem ser aprimorados para melhorar a concordância entre classificação, conduta oferecida e evolução dessa neoplasia^{4, 7-11}.

O CBDT apresenta bom prognóstico, com sobrevivência em cinco anos acima de 90% quando tratado da maneira preconizada^{4, 12-15}. Contudo, se esse fato é verdadeiro, também é verdade que boa parte das operações realizadas sobre a glândula tireóide têm intuito diagnóstico e não francamente terapêutico, como seria o ideal. Procedimentos diagnósticos, como a ultrassonografia com Doppler e o exame citológico por punção

aspirativa com agulha fina, oferecem apoio a uma das mais difíceis decisões da prática clínica: quando não indicar a exérese cirúrgica. De todas as punções compatíveis com padrão folicular – nas quais não é possível definir se a natureza da doença é maligna ou benigna – apenas em 10 a 30% é encontrado carcinoma ao estudo anátomo-patológico definitivo¹⁶⁻²².

Nessa situação, o procedimento cirúrgico para diagnóstico torna-se obrigatório e, incorre-se no risco de submeter portadores de lesões benignas à tireoidectomia – em alguns casos associada à morbidade – para evitar a eventualidade de simplesmente considerar um nódulo tireóideo maligno como benigno.

Tomada a decisão pela exérese cirúrgica e confirmado o diagnóstico de carcinoma, podem restar controvérsias quanto à extensão da operação e à necessidade do esvaziamento eletivo^{5, 8, 9, 13, 14, 18, 23}. A ocorrência de carcinoma multicêntrico, assim como de metástase linfática cervical, mostra-se elevada e a reoperação nessa região é relacionada a maior número de complicações^{12, 24-27}.

Quanto ao prognóstico, há relatos de até 20% de recidiva associada ao CBDT, das quais 30% não são passíveis de cura completa. A mortalidade pode atingir 16%, principalmente na faixa etária mais elevada e na presença de metástase hematogênica^{15, 18, 28}. Dessa forma, para o acompanhamento adequado, utilizam-se critérios que tentam identificar os casos de pior prognóstico, desde a semiologia até a meticulosa avaliação anátomo-patológica do carcinoma. Mais recentemente, têm-se agregado estudos com marcadores biológicos^{9, 29-34}.

Nos últimos anos, foram propostos índices de risco com base em

fatores prognósticos, na tentativa de identificar elementos clínicos e histopatológicos relacionados à má evolução^{23, 28}. Não foram porém capazes de identificar, com segurança, os doentes com maior risco de metástase linfática cervical que, embora não altere a sobrevivência, exige reabordagem cirúrgica e eleva a probabilidade de complicações³⁵⁻³⁹. O notório registro de que mesmo alguns carcinomas classificados como de baixo risco evoluem de forma mais agressiva, indica a necessidade de métodos para melhor caracterizar o carcinoma bem diferenciado e assim permitir a escolha da abordagem terapêutica mais adequada^{40, 41}.

Os métodos relacionados com a biologia celular e molecular, vieram a esclarecer muitos dos fenômenos responsáveis pelo comportamento das neoplasias malignas e atualmente aliam-se aos recursos disponíveis para o diagnóstico e tratamento mais eficazes^{4, 9, 30, 42-46}.

O tratamento complementar e o seguimento pós-operatório ainda dão margem a discussões. É o que ocorre com a indicação da pesquisa de corpo inteiro e da radioiodoterapia para os casos de baixo risco^{18, 28, 47}.

A discriminação da natureza benigna *versus* maligna de determinadas proliferações celulares, sua classificação em subtipos e a avaliação prognóstica constituem as principais indicações para estudos que envolvem marcadores biológicos pela imunohistoquímica, que é técnica difundida em nosso meio^{30-33, 48-52}. Dentre eles, a galectina-3 tem sido amplamente estudada em muitas neoplasias. É marcador de transformação maligna, provavelmente relacionado à progressão, invasão e formação de metástase⁵³⁻⁵⁵. Resultados sugerem sua utilidade no refinamento da identificação pré-operatória do CBDT pela punção aspirativa e em grandes

centros já é empregada de rotina^{29, 56-58}. Porém, seu papel na distinção de lesões benignas e malignas da glândula tireóide, ainda é controverso^{53, 59, 60}.

Embora tenha sido descrita uma gama de funções exercidas pela galectina-3 nos compartimentos celulares de diferentes tecidos benignos e malignos^{54, 55, 61-63}, no CBDT, o papel dessa proteína não foi totalmente esclarecido nem há consenso quanto a sua relação com as principais capacidades adquiridas pelas células malignas tais como a proliferação celular descontrolada, o bloqueio da apoptose e estímulo da angiogênese, dentre outras^{53, 55, 57}. Além disso, percebe-se que os resultados conflitantes são, por vezes, fruto da aplicação de método subjetivo, sem atentar para a possibilidade de haver diferentes padrões e intensidades de expressão da galectina-3 nos diversos compartimentos celulares. Outras vezes são derivados de casuística heterogênea que incorpora neoplasias de origens celulares diferentes tais como o CBDT e o carcinoma medular^{57, 64}.

Frente a essas considerações e com o intuito de procurar critérios que possam auxiliar tanto na tarefa de melhor classificar o CBDT quanto na obtenção de índices objetivos correlacionáveis com a evolução desses carcinomas, foi idealizada a presente pesquisa, motivada pela observação das existentes dificuldades no trinômio diagnóstico – tratamento – evolução, durante o atendimento aos doentes do HC-FMUSP.

A presente investigação objetivou responder se a galectina-3 pode auxiliar no diagnóstico do CBDT e na seleção de seu tratamento. Para verificar tal hipótese, baseou-se na quantificação da imunoexpressão desse marcador nos diferentes compartimentos do tireócito maligno. Foi aplicado método objetivo de análise, em casuística homogênea de mais de uma

centena de doentes, distribuídos em número equivalente de casos sem e com metástase, manifestação incontestável de malignidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O CARCINOMA BEM DIFERENCIADO DA GLÂNDULA TIREÓIDE

A incidência do CBDT, estimada em torno de 0,5 a 10:100.000 por ano, é duas a três vezes maior entre as mulheres, com um pico dos sete aos 12 anos de idade e outro, maior, entre os 40 e 65 anos^{3, 4, 7}.

Apesar das numerosas pesquisas realizadas, a etiologia não foi inteiramente esclarecida e seu único fator causal bem reconhecido é a irradiação ionizante da região cervical⁴.

O carcinoma papilífero é o CBDT mais comum e constitui 60 a 90% dos carcinomas primários da glândula tireóide. A frequência de carcinoma folicular pode atingir até 40% em algumas séries^{1, 4, 6}. Em análise de tireóides retiradas em necrópsias consecutivas foi encontrado de 3 a 36% de carcinoma papilífero⁶⁵⁻⁶⁸.

À exceção da concomitância de nódulo tireóideo com linfonodomegalia cervical, os demais achados clínicos pouco contribuem para a suspeita diagnóstica do CBDT. Sintomas e sinais associados à presença de malignidade são incomuns e o diagnóstico do CBDT baseia-se principalmente no exame ultrassonográfico associado ao exame citológico do material aspirado por agulha fina^{4, 26}. As características ultrassonográficas sugestivas de malignidade são: nódulo hipoeecogênico, limites irregulares, microcalcificação, hipervascularização nodular central,

com altos índices de resistividade e pulsatilidade^{69, 70}. O exame citológico do material obtido pela PAAF é sensível para o diagnóstico especialmente do carcinoma papilífero. No entanto não é possível assegurar a real natureza do nódulo quando a amostra é escassa ou se o material aspirado exibir apenas o padrão folicular tireóideo. O laudo citológico limitado ao “padrão folicular” ocorre em 15 a 22% dos exames^{16, 22, 71, 72}.

A classificação do CBDT em subtipos histológicos atualmente utilizada é a da AFIP¹, Instituto de Patologia das Forças Armadas de Washington. Os carcinomas foliculares são designados, conforme sua capacidade de invasão, como extensamente ou minimamente invasivos. O carcinoma papilífero é classicamente caracterizado pela formação de estruturas histológicas papilares dotadas de eixo conjuntivo vascular revestido por células foliculares neoplásicas com características nucleares específicas: cromatina clara, pseudo-inclusões e fendas nucleares. Seus subtipos histológicos segundo a classificação AFIP são mostrados no ANEXO A – Quadro A1.

Nem sempre pode ser demonstrada a presença dos critérios que definem o carcinoma folicular, tais como as invasões capsular e vascular. Isso impossibilita a distinção histológica entre o carcinoma e o adenoma folicular em alguns casos, aos quais é dada a denominação de neoplasia folicular de comportamento maligno indeterminado. O carcinoma papilífero, quando não apresenta claramente fendas nucleares e núcleos vazados, pode ser confundido com a hiperplasia papilífera¹.

As características de invasão tecidual local descritas no CBDT são: invasão da cápsula nodular, extensão extratireóidea, invasão vascular

sangüínea ou linfática e perineural¹.

A frequência de carcinomas multicêntricos é de 20% a 88% em algumas séries^{4, 73}.

O carcinoma papilífero apresenta tendência ao desenvolvimento de metástase linfática cervical, enquanto que o folicular está mais relacionado à disseminação hematogênica^{1, 4, 28}.

A incidência de metástase linfática no CBDT mais comumente relatada é de 36% mas oscila entre 16 e 80%. Mesmo se considerado apenas o microcarcinoma (menores de 10 mm), a incidência de metástase linfática é de 16 a 40%. A disparidade observada é decorrente das diferentes condutas adotadas. O número de casos diagnosticados é maior quando realizados o esvaziamento linfático cervical sistemático e a pesquisa de micrometástases^{4, 25, 74-76}.

A ocorrência de metástase hematogênica é de 4%, sendo 2,3% no carcinoma papilífero e 11% no folicular^{4, 77, 78}.

É evidente a associação da presença de metástase hematogênica com a piora do prognóstico no CBDT. Quanto à metástase linfática, que ocorre em maior frequência na faixa etária mais jovem, esta não influenciou a sobrevivência global na maioria das séries estudadas^{35-39, 79}. Foi descrita, entretanto, sua associação com maior índice de recidiva^{4, 25, 26, 28, 78, 80} e dessa forma à piora da qualidade de vida nos casos de reoperação^{24, 28, 37, 81, 82}.

A classificação TNM e estadiamento do CBDT segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC) são mostrados no ANEXO A –Tabela A1 e Tabela A2.

A classificação dos doentes em grupos de risco segundo fatores prognósticos foi proposta por vários autores^{8, 23, 36, 37, 40, 83}. A classificação idealizada por Cady⁸⁴ e colaboradores em 1979 foi chamada de AMES, sigla composta pelas iniciais, em inglês, dos fatores prognósticos relacionados ao CBDT, em sua série (ANEXO A – Tabela A3). Os fatores considerados para essa classificação estiveram associados ao prognóstico em praticamente todas as séries e dessa forma é ela a mais utilizada na prática clínica²⁸. Shaha⁸⁵ e colaboradores, em 1998 descreveram a distribuição dos doentes em três grupos de risco (ANEXO A – Tabela A4) utilizando os fatores prognósticos descritos para a classificação AMES.

Diante do diagnóstico confirmado de CBDT o tratamento recomendado é a tireoidectomia total. Entretanto, alguns centros preconizam a tireoidectomia parcial para os casos classificados em grupos de baixo risco^{9, 86}.

Apesar da alta frequência de metástase linfática, ainda há controvérsias quanto à indicação do esvaziamento linfático cervical sistemático. Defensores de diferentes condutas ilustram a literatura.

Grupos americanos alegam que metástase linfática não altera a sobrevivência dos indivíduos acometidos e que o esvaziamento linfático cervical pode aumentar a incidência de complicações pós-operatórias e por isso não recomendam o esvaziamento de rotina^{5, 75, 78, 87-89}. Em contrapartida, a maioria das escolas japonesas e européias consideram que a reoperação devido a metástase remanescente é um fator que influi na qualidade de vida e que a segunda operação tem maior risco de complicações que a primeira, portanto o esvaziamento sistemático deve ser

realizado em todos os doentes^{81, 90-92}.

A comparação dos guias de conduta das sociedades americanas e européias, quanto ao esvaziamento linfático, evidencia a controvérsia. Na Europa, os maiores defensores do esvaziamentos provêm das escolas francesa^{11, 93, 94}, alemã^{81, 95}, italiana⁷⁶, espanhola⁹⁶, holandesa⁹⁷, suíça⁹⁸, polonesa⁹⁹ e mesmo da Inglaterra, onde a *British Thyroid Association* do *Royal College of Physicians*¹⁰ indica o esvaziamento do compartimento central ainda que não haja linfonodomegalia palpável no intra-operatório.

A procura de fatores preditivos da ocorrência de metástase linfática é uma forma de identificar a real necessidade ou a extensão do esvaziamento cervical em doentes sem evidência pré ou intra-operatória de acometimento maligno dessas estruturas.

Os métodos diagnósticos pré-operatórios atualmente empregados e a classificação dos doentes em grupos de risco segundo fatores prognósticos não são suficientes para determinar o potencial de metástase linfática no CBDT. Linhas de pesquisa baseadas em marcadores biomoleculares estão sendo desenvolvidas na tentativa de esclarecer a questão^{4, 9, 30, 42, 46}.

A definição do prognóstico de qualquer processo patológico é fundamental para a escolha da terapia. Modelos matemáticos podem ser utilizados com esse intuito. Entre eles, o de previsão de um evento binário pela equação de regressão logística e o baseado na rede neural artificial são os mais difundidos na área médica¹⁰⁰⁻¹⁰². Ambos têm a propriedade de identificar variáveis independentes relacionadas ao evento binário a ser previsto, como por exemplo: recorrência pós-operatória de neoplasia maligna, desenvolvimento de metástase e evolução para óbito.

Em um estudo envolvendo 5123 indivíduos acometidos por CBDT, Lundgren¹⁰³ e colaboradores, em 2006, aplicaram o modelo de regressão logística para calcular o risco de óbito, ou seja, mortalidade.

Assim como as características clínicas e anátomo-patológicas, os biomarcadores podem ser adicionados como variáveis no modelo de predição logística do risco de metástase de determinado carcinoma¹⁰⁴.

Dentre os marcadores mais estudados no CBDT encontra-se a galectina-3. Sua análise pela técnica de imunohistoquímica já é utilizada na prática clínica em grandes centros^{29, 56-58, 105}.

Após o tratamento cirúrgico, deve ser feita a pesquisa de corpo inteiro com iodo marcado e recomenda-se a realização de radioiodoterapia complementar nos doentes com captação superior a 1%. Porém sua indicação nos casos de baixa captação é controversa. Além disso, a levotiroxina sódica deve ser administrada em níveis adequados para instituição da terapia supressiva^{4, 9, 18, 28, 47}.

O seguimento é feito com dosagens sanguíneas periódicas da tireoglobulina sérica, bastante confiável desde que não exista nível elevado de anticorpos anti-tireoglobulina. Resultados ascendentes sugerem recidiva do CBDT^{4, 9}.

A sobrevivência global em cinco anos relatada para o CBDT é de 83 a 99%, com mortalidade de 8 a 17%, associada à faixa etária elevada e metástase hematogênica. A taxa de recidiva ou persistência da doença varia de 20 a 25% e é mais elevada nos casos com acometimento linfático cervical^{4, 15, 18, 26-28, 39, 106}.

2.2. IMUNOEXPRESSÃO DE MARCADORES BIOLÓGICOS NO CBDT

Imunohistoquímica é o procedimento pelo qual é feita a marcação de moléculas celulares e componentes da matriz extracelular com anticorpos conhecidos, para permitir sua identificação ou quantificação. As principais indicações do estudo imunohistoquímico de marcadores biológicos são: discriminação da natureza benigna *versus* maligna de determinadas proliferações celulares; subtipagem de neoplasias; avaliação prognóstica³⁰.

A tireoglobulina e as citoqueratinas são exemplos de marcadores bem estabelecidos tanto para o tecido tireóideo normal como em doenças tireóideas benignas e malignas³⁰.

Quantificação da imunoexpressão de marcadores

A técnica de determinação do índice de positividade da imunoexpressão mais difundida desde 1988 é a técnica de contagem de pontos (*point counting*) semi-quantitativa baseada nos estudos de Gundersen¹⁰⁷, associada à análise ponderada subjetiva da intensidade de expressão¹⁰⁸.

A análise digital da imagem é o exame de imagens capturadas por fotografia digital, realizado com o auxílio de programas de informática. Permite a determinação de valores numéricos para exprimir características da imagem¹⁰⁹.

Em 1980, Schuh⁸² utilizou pela primeira vez a análise digital da imagem em espécimes citológicos coletados por PAAF de neoplasias tireóideas. Desde então, uma série de pesquisas têm utilizado o método para análise

morfométrica e quantificação da imunoexpressão de marcadores biológicos¹¹⁰⁻¹²⁰. Abdo-Banhos¹²¹, em 2004, utilizou a análise digital para avaliação morfométrica de nucléolos marcados com prata de células tireóideas em proliferação.

A vantagem do método digital é quantificar a intensidade de expressão de um dado marcador. Dessa forma, permite a obtenção de uma variável numérica contínua, que pode ser mensurada para cada compartimento celular de forma independente, e pode ser aplicada em modelos matemáticos de previsão de risco e estabelecimento de fatores prognósticos^{104, 116, 119, 122}.

A quantificação da imunoexpressão da galectina-3 pela análise digital foi relatada em apenas dois estudos: um realizado em citoplasma de astrócitos¹²³ e outro em linfomas¹²⁴.

2.3. GALECTINA-3

2.3.1. ESTRUTURA E FUNÇÃO

A galectina-3 é uma proteína com peso molecular de 30 kDa. Historicamente é classificada como pertencente à família das proteínas de ligação do β -galactosídeo (*β -galactoside-binding protein*), que por sua vez pertencem ao grupo das lectinas. Foi também chamada de ϵ BP (*IgE-binding protein*), pela capacidade de ligar-se à imunoglobulina-E, ou de Mac-2 por ser um antígeno de superfície de macrófago¹²⁵.

As lectinas foram descritas pela primeira vez por Harmon¹²⁶, em 1977,

como componentes dos complexos de membrana-DNA (M-Bands) no núcleo do *Bacillus subtilis*. Powell¹²⁷, em 1980, isolou as lectinas do tecido pulmonar humano.

Os carboidratos estão presentes na superfície de todas as células e na matriz extracelular como constituintes da porção glicídica das glicoproteínas e glicolípides. A porção glicídica dessas estruturas, por sua vez, é formada por um conjunto de oligossacarídeos que participam de funções celulares específicas⁶¹.

As lectinas, proteínas de ligação de carboidratos, possuem em sua conformação receptores que reconhecem estruturas oligossacarídicas específicas. Estas são então denominadas ligantes e suas respectivas glicoproteínas ou glicolípides chamadas de contra-receptores. Como exemplos desse mecanismo encontram-se a adesão de leucócitos a oligossacarídeos do endotélio vascular, adesão celular a oligossacarídeos da laminina, constituinte da membrana basal, dentre outras^{61, 125}.

Os vertebrados possuem dois grupos de lectinas: lectinas do tipo C, que necessitam de cálcio para sua ligação com os respectivos oligossacarídeos; e lectinas tipo S, cálcio independente. A este grupo pertencem as galectinas que recebem essa denominação por reconhecerem, em sua porção C-terminal, especificamente oligossacarídeos contendo galactose⁶¹.

Foram descritos até então 14 membros da família das galectinas, que apresentam domínio de ligação do carboidrato semelhante, com pequenas diferenças, suficientes para que promovam funções biológicas diferentes. As mais extensamente estudadas são as galectinas 1 e 3^{61, 128}.

A pesquisa da estrutura da galectina-3 revelou que se trata de um monômero com dois domínios funcionais: um C-terminal para ligação com oligossacarídeos (carboidratos) e outro N-terminal, rico em seqüências repetitivas de prolina, glicina e tirosina, para ligação com RNA e DNA (nucleotídeos) (Figura 1). Estas galectinas podem associar-se entre si e promoverem a ligação cruzada de contra-receptores glicoprotéicos¹²⁸⁻¹³⁰.

Figura 1 – Representação da estrutura da proteína galectina-3, evidenciando as porções amino e carbóxi-terminal, ligadas aos respectivos contra-receptores.

Na célula, a galectina-3 pode localizar-se no nucleoplasma, região nucleolar e demais corpúsculos nucleares, na mitocôndria, no citoplasma perinuclear/ peri-mitocondrial, na periferia do citoplasma junto à membrana citoplasmática ou na própria bicamada desta. Também pode ser secretada para desempenhar diversas funções na matriz extracelular¹³⁰⁻¹³².

Quanto à localização tecidual encontra-se principalmente nos monócitos, macrófagos e células epiteliais^{130, 133} (Tabela 1). Akimoto¹³⁴ e colaboradores, em 1995, descreveram a presença dessa proteína na superfície celular dos queratinócitos da pele humana, núcleo e citoplasma das células de Langerhans e fibroblastos.

Em 1992, Chiarotti¹³⁵ e colaboradores estudaram pela primeira vez a expressão do gene das galectinas no tecido tireóideo normal e nos carcinomas que o acometem: encontraram que havia associação de altos níveis de RNAm das galectinas com a expressão do fenótipo maligno.

Tabela 1 – Distribuição tecidual da galectina-3^{61, 128, 130}.

<i>Tecido</i>
<i>Distribuição tecidual normal em humanos</i>
Córnea e conjuntiva
Epitélio gástrico e colônico
Epitélio mamário
Epitélio prostático e renal
Endotélio
Eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos
<i>Expressão patológica</i>
Células basofílicas leucêmicas de ratos
Linfoma anaplásico de grandes células
Células T infectadas por HTLV
Carcinoma de mama
Carcinoma de tireóide
Carcinoma epidermóide de laringe
Carcinoma de estômago e cólon
Carcinoma de próstata
Melanoma
Fibrossarcoma
Neoplasias malignas do sistema nervoso central

Seus principais contra-receptores biológicos são mostrados na Tabela 2. É importante ressaltar que alguns contra-receptores não apresentam função conhecida e que diferentes membros do grupo das galectinas podem

competir entre si, tornando a interpretação de suas funções controversa em alguns tecidos^{61, 130}.

Tabela 2 – Principais contra-receptores biológicos para galectina-3^{61, 130}.

<i>Contra-receptor</i>	<i>Sítio de ligação</i>	<i>Localização</i>
Glicoproteínas de membrana associadas a lisossomos	C	E/I
Região constante de imunoglobulinas épsilon	C	E
Receptores Fc	C	E
Laminina	C	E
Antígeno cárcino-embriogênico (CEA)	C	E
Proteínas de ligação de MAC-2	C	E
Bcl-2	C	I
Porção de carboidrato de lipopolissacarídeos	C	E
Porção lipídica de lipopolissacarídeos	NC	E
RNA e ssDNA	NC	I

C = porção carbóxi-terminal; NC = porções amino e carbóxi-terminal; E = extracelular; I = intracelular.

A galectina-3 é uma proteína ubíqua e multifuncional, desempenha papéis na matriz extracelular e nos compartimentos intracelulares (Tabela 3). Nesses últimos, pode não envolver ligações com oligossacarídeos como principal mecanismo e até então, não são conhecidos todos os passos biomoleculares de suas funções no núcleo e citoplasma. A função final resultante da atuação da galectina-3 depende de sua localização, quantidade de expressão e do tipo de contra-receptor envolvido, pois é ele que irá fazer a transdução do sinal e promover as conseqüentes alterações celulares. O entendimento do efeito específico para cada célula irá permitir a

modulação terapêutica dessas atividades nas doenças que acometem os seres humanos^{61, 63, 125, 136-138}.

Tabela 3 – Funções atribuídas à galectina-3^{61, 130}.

<i>Função</i>
<i>Adesão</i>
Homotípica entre células neoplásicas
Neutrófilo à laminina
<i>Inflamação</i>
Resposta alérgica ligando IgE e receptores Fc
Produção de IL-1 por monócitos humanos
Ativação de neutrófilos humanos e liberação de superóxido
<i>Outras atividades</i>
Processamento pós-transcricional de RNAm, RNAr, RNAt
Inibição da via intrínseca e indução a via extrínseca

Moutsatsos¹³¹ e colaboradores, em 1987, descreveram a participação da galectina-3 nucleoplasmática na proliferação celular de maneira indireta. Ao estudar os fibroblastos em proliferação (células 3T3) observaram que o promotor do segundo *íntron* do gene da galectina-3 está sujeito à inibição pelo p53, inibidor tumoral e regulador do ciclo celular. Dessa forma, há diminuição da expressão da galectina-3 e diminuição associada da proliferação celular. Além disso, há evidências da participação da galectina-3 nuclear no processamento do pré-RNAm e RNAr, além de ter sido encontrada ligada à fita simples de DNA (ssDNA)^{61, 63, 139}.

Liu¹²⁵ e colaboradores, em 1996, observaram que a galectina-3 protege as células T da apoptose pela via intrínseca, por sua capacidade de dimerizar-se com a proteína anti-apoptótica Bcl-2, na membrana mitocondrial

externa¹³⁹.

Demonstrou-se também que a galectina-3 participa da formação de capilares *in vitro* e *in vivo* por um processo carboidrato dependente^{140, 141}.

Ao estudar a função da galectina-3 em doenças, observou-se que se trata de importante modulador da função mielóide, dos macrófagos e neutrófilos, que exibem altos níveis quando ativados em processos inflamatórios (Tabela 3)^{61, 125}.

Quanto à sua participação em neoplasias, foi demonstrada maior concentração nos tecidos malignos quando comparados aos benignos. A galectina-3 já foi estudada como um marcador do potencial metastático para carcinoma mamário, gástrico, colônico, laríngeo, epidermóide avançado de cabeça e pescoço e tumores malignos do sistema nervoso central¹⁴²⁻¹⁴⁸.

Em algumas neoplasias de origem epitelial como o carcinoma de mama e tireóide, baixos níveis de galectina-3 parecem favorecer o desenvolvimento de metástase, mas fatores tumorais podem alterar essa relação. No carcinoma de cólon foi demonstrado o inverso^{149, 150}.

Existem poucos estudos que relatam a expressão da galectina-3 entre os diferentes compartimentos da célula maligna. Califice¹⁴⁰ e colaboradores, ao estudar o carcinoma de próstata em 2004, encontraram que a expressão citoplasmática da galectina-3 induz invasão da matriz extracelular, proliferação não dependente da ancoragem da célula à matriz, angiogênese e menor taxa de apoptose. Ao mesmo tempo, avaliaram a expressão nucleoplasmática da proteína, que se correlacionou com todos esses eventos de maneira inversa. Concluem que a galectina-3 apresenta efeitos biológicos antagônicos de acordo com sua localização subcelular. No CBDT,

a imunoexpressão da galectina-3 no núcleo foi descrita por dois autores que não encontraram correlação com achados clínicos ou anátomo-patológicos^{64, 151}.

Hubert¹⁵², em 1995, demonstrou a presença da galectina-3 na zona fibrilar densa do nucléolo à microscopia eletrônica, em fibroblastos. Purkrabkova, em 2003, ao estudar a função da galectina-3 no nucléolo, em cultura de células da medula óssea, observou que não houve correlação dessa expressão com o índice de proliferação celular¹⁵³.

No carcinoma tireóideo, Friedman¹⁵⁴, em 1979, descreveu a importância das características nucleolares ao exame citológico pré-operatório. O mesmo foi confirmado por Montironi¹⁵⁵ em 1991. Não há na literatura consultada estudos que considerem a imunoexpressão da galectina-3 no nucléolo das células do CBDT.

Bartolazzi²⁹ e colaboradores, em 2001, ao estudarem uma casuística composta por 226 doentes, encontraram 100% de sensibilidade e 98% de especificidade para o diagnóstico pré-operatório do carcinoma tireóideo quando havia imunoexpressão citoplasmática da galectina-3 nos espécimes obtidos pela PAAF. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores que descrevem positividade citoplasmática de padrão e intensidade variáveis da galectina-3 no CBDT quando comparado a lesões benignas^{34, 48, 56, 58, 151}. Contudo há trabalhos que demonstram positividade fraca e focal de algumas lesões benignas^{60, 156}.

Em 2002, Herrmann⁶⁴ e colaboradores descreveram a imunoexpressão citoplasmática da galectina-3 no tecido tireóideo benigno e no carcinoma ao estudar 62 casos. Encontraram que houve forte expressão da galectina-3 no

carcinoma papilífero e menos intensa no folicular e anaplásico. Relataram também expressão nos linfócitos e nas células foliculares da área de tireoidite e reatividade das células endoteliais.

Kawachi⁵³ e colaboradores, em 2000, estudaram 246 neoplasias tireóideas e encontraram concentração maior da galecina-3 citoplasmática nos carcinomas papilíferos com metástase.

2.3.2. PROLIFERAÇÃO CELULAR

O processo de proliferação celular é coordenado pelo núcleo e é na região nucleolar onde ocorrem alguns dos processos mais importantes envolvidos no mecanismo.

O núcleo

Franz Bauer¹⁵⁷ descreve a presença do núcleo celular em 1802. Nessa época já discute a intensa modificação da estrutura ocorrida durante a mitose e suspeita de que se trata de uma entidade dinâmica¹⁵⁸.

Sabe-se que o núcleo é um compartimento celular complexo, composto de mais de uma dezena de estruturas integradas entre si, delimitado pela membrana nuclear. O fluido que preenche o espaço entre as estruturas nucleares chama-se nucleoplasma. No núcleo encontra-se a maior parte dos genes, pois existe também o DNA extranuclear mitocondrial¹⁵⁹.

As primeiras estruturas subnucleares descritas foram o nucléolo e o corpúsculo de Cajal. O nucléolo, como será descrito mais a diante, também é subdividido em pelo menos três compartimentos e numa zona perinucleolar.

Além deste e do corpúsculo de Cajal, outras estruturas conhecidas até o momento são: os corpos PML, os *Gems*, os *speckles* e os *paraspeckles*. O nucleoplasma também é dividido em região de eucromatina e de heterocromatina¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

As estruturas nucleares participam direta ou indiretamente dos processos de duplicação, transcrição ou tradução. As proteínas, ribonucleoproteínas e diversas categorias de RNA que fazem parte da fisiologia nuclear, trafegam de forma ordenada e contínua entre os compartimentos nucleares, e entre o núcleo e o citoplasma¹⁶¹.

Ao contrário das organelas citoplasmáticas que são, em sua maioria, entidades permanentes, a formação e desagregação das estruturas nucleares refletem a atividade específica do compartimento. Quando essa tarefa não é mais necessária em uma determinada fase do ciclo celular, a estrutura desagrega-se e passa a não ser mais visível¹⁵⁹.

A galectina-3 nucleoplasmática

Em 2003, Paron¹⁶² demonstrou o papel da galectina-3 imersa no nucleoplasma, onde atua como fator de transcrição em conjunto com o TTF-1. O dímero tem a capacidade de acoplar-se à fita simples de DNA e, pela ativação de oncogenes, conferir à célula um fenótipo mais agressivo.

Em 2004, Kurihara¹⁵⁷ demonstra, em carcinoma tireóideo, a participação da galectina-3 nuclear em outra via pró-oncogenética: a via da β -catenina. O autor demonstra que o acoplamento direto da galectina-3 à β -catenina, induz à transcrição dos oncogenes da ciclina-D1 e c-myc. As proteínas traduzidas a partir da transcrição desses genes têm provado papel

oncogenético.

Foi demonstrado o papel da galectina-3 na biogênese, organização e transporte de pequenas ribonucleoproteínas, assim como seu papel direto no processamento do RNA ribossômico e mensageiro, fazendo parte do complexo ribonucleoprotéico SMN¹⁶³.

A região nucleolar

O nucléolo é uma aquisição evolutiva das células eucarióticas e foi descrito à microscopia óptica em 1836¹⁶⁴.

É composto pelo encontro de regiões específicas dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22. Essas regiões possuem genes que codificam RNA ribossômico e que se aglomeram na região onde será organizado o nucléolo durante a fase de síntese^{165, 166}.

O nucléolo pode ser dividido em três regiões. A região onde os segmentos de DNA dos cinco cromossomos se agrupam é chamada de centro fibrilar. Ao redor dessa dispõem-se duas outras regiões, a primeira chamada componente fibrilar denso e a segunda e mais externa, componente granuloso. Ao redor da estrutura encontra-se ainda a região perinucleolar.

A transcrição dos genes ribossômicos ocorre na periferia do centro fibrilar e o RNA ribossômico dispõe-se entre esse e o componente fibrilar denso. Neste último, inicia-se o processamento pós-transcricional do RNAr. A maturação final dos ribossomos será realizada no componente granuloso¹⁶⁷.

Sabe-se que além da produção de ribossomos, no nucléolo ocorre

processamento de RNA transportador e mensageiro, controle de replicação viral, controle de ciclo celular, de replicação do DNA, do fenômeno de senescência, da progressão maligna e da supressão tumoral^{167, 168}.

Como todas as estruturas intranucleares, o nucléolo só é formado quando suas funções são necessárias. É formado durante a fase S (de Síntese) celular, desaparece durante a mitose e volta a se formar quando é novamente necessário. Durante a fase S, uma célula pode ter de um a mais de 10 nucléolos, dependendo da atividade sintética. A quantidade, o volume e a localização (no centro ou periferia do núcleo) dos nucléolos refletem a intensidade do seu funcionamento^{155, 169}.

Tecidos com intensa atividade proliferativa necessitam de volumosa síntese de ribossomos para a tradução de proteínas, por isso apresentam nucléolos bem visíveis, numerosos e na posição periférica do núcleo. As características nucleolares auxiliam no diagnóstico diferencial entre tumores benignos e malignos^{155, 170}.

Em adenomas e carcinomas foliculares tireóideos, o volume, a quantidade e a localização intranuclear do nucléolo são considerados como variáveis que podem auxiliar na sua classificação¹⁵⁵.

A galectina-3 na região nucleolar

Em 1987, Moutsatsos¹³¹ descreveu o papel da galectina-3 na proliferação de células neoplásicas, atuando no nucléolo como um fator associado à produção e processamento de ribossomos. Em 1995, Dagher¹⁷¹ comprovou a participação da galectina-3 no processamento do RNA mensageiro de células malignas. No mesmo ano, Hubert¹⁵² definiu a exata

localização da molécula na região fibrilar densa do nucléolo, onde atua no processamento e maturação do RNA ribossômico. Demonstrou o seu envolvimento no processo de diferenciação e proliferação celular.

Proliferação celular e marcadores imunohistoquímicos

A relação entre o número de células que estão em processo de proliferação e o número daquelas em repouso, é um índice utilizado para classificar neoplasias em graus de malignidade. Carcinomas agressivos possuem elevada atividade mitótica. A contagem direta do número de células em divisão à microscopia óptica, pode ser associada a outros meios de quantificação. Dentre eles, os mais utilizados são a marcação celular pela timidina tritiada (T [H3]), das regiões organizadoras de nucléolo pela prata (AgNOR) e a citometria de fluxo¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Embora o antígeno Ki-67 (ou MIB-1) seja uma proteína nuclear de função desconhecida, à imunohistoquímica é um marcador específico de proliferação celular^{30, 175}. O marcador PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) tem associação com a síntese de DNA e também pode ser empregado à imunohistoquímica³⁰. Esse último foi estudado no tumor primário e no tecido metastático do CBDT³³. Quanto ao Ki-67, já foi amplamente estudado no carcinoma tireóideo e obteve-se que o CBDT é caracterizado pelo baixo grau de proliferação celular¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

A associação entre a imunoexpressão citoplasmática da galectina-3 e expressão do Ki-67 já foi investigada nos carcinomas gástricos, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e carcinoma de paratireóide. Não há relatos dessa análise no CBDT¹⁷⁹⁻¹⁸².

2.3.3. APOPTOSE

Os antigos gregos intrigavam-se com o fenômeno outonal da mudança de cor, textura e finalmente queda das folhas de algumas árvores. Percebiam que era um fenômeno diverso da morte de algumas árvores acometidas por processos patológicos. Chamaram a “morte” programada durante o inverno de *apoptosis*¹⁸³.

A todo o momento, em indivíduos pluricelulares, originam-se células com características neoplásicas, porém, mecanismos de autocontrole evitam que estas se proliferem e desenvolvam massas tumorais. Um dos mecanismos é a indução destas células à morte programada^{184, 185}.

O processo apoptótico tem por objetivo a eliminação de células que por algum motivo tornaram-se desnecessárias ou lesivas ao equilíbrio tecidual. Envolve diversas macromoléculas, que agem em cascata, sendo indispensável a participação das proteínas pertencentes à família das asparaginases da porção C-terminal, as C-asparaginases (ou caspases)¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

A via final da apoptose é o empacotamento organizado das macromoléculas celulares em vesículas apoptóticas, com antígenos de superfície que são reconhecidos por receptores nas células vizinhas, que interagem com os corpos apoptóticos e agem como fagócitos¹⁸³.

Quem processa as moléculas para que possam ser empacotadas nos corpos apoptóticos são as caspases. São conhecidas pelo menos nove caspases. Estas e outras moléculas que fazem parte no processo são produzidas em maior quantidade quando a apoptose é desencadeada. A

caspase-3 é a via final efetora dessa cascata e a sua forma ativa pode ser quantificada no citoplasma à imunohistoquímica, pela utilização do anticorpo anti-caspase-3 p20^{183, 189, 190}.

Ahmad¹⁹¹ e colaboradores, em 2000, estudaram a caspase-3 no carcinoma tireóideo e Kasper¹⁹², no mesmo ano, estudou sua associação com a galectina-3 em carcinomas de pulmão.

A ativação das caspases

Dois processos de ativação das caspases são conhecidos: a via intrínseca, e a via extrínseca¹⁸³.

A via intrínseca tem como estrutura chave a mitocôndria. A organela é dotada de membrana externa e interna e, no espaço entre elas, o citocromo-c é abundante. A integridade estrutural e funcional da mitocôndria é fundamental para impedir a liberação do citocromo-c para o citosol e a conseqüente ativação da via das caspases^{183, 186, 188}.

O estímulo pró-apoptótico faz com que a integridade estrutural e funcional da mitocôndria seja perturbada. A desestruturação da transmissão de elétrons das cristas da membrana interna, a perda do potencial transmembrana e a presença de poros liberam o citocromo-c para o citosol. A família de moléculas chamada de Bcl-2 está envolvida nesse processo. Várias hipóteses são aventadas, mas a mais aceita é que o Bcl-2 e outra molécula da mesma família (Bax) formam dímeros na superfície da membrana externa que são verdadeiros poros controladores da liberação do citocromo-c para o citosol^{183, 187}.

A via extrínseca não envolve a mitocôndria e a liberação do

citocromo-c. É desencadeada pela interação entre receptores de membrana, como o Fas e o TRAIL, com os seus respectivos ligantes. Essa interação ativa segundos mensageiros intracelulares que resultará na ativação da caspase-8 citoplasmática e, por conseguinte, da cascata das caspases até a via final do processo^{191, 193}.

Apoptose e galectina-3 citoplasmática

As células malignas utilizam a galectina-3 para bloquear a via intrínseca da apoptose no seu próprio citoplasma e desencadear a extrínseca nas células vizinhas^{130, 193}. Nos dois casos, tem um papel na progressão maligna e aumento da agressividade¹⁸³.

A célula produtora de galectina-3 utiliza a molécula para si própria para se “imortalizar”, ou seja, como anti-apoptótica bloqueando a via intrínseca no seu próprio citoplasma. Porém, para as células do sistema imune, que podem agredi-la, a célula maligna secreta a galectina-3 para o espaço extracelular onde é pró-apoptótica e induz os linfócitos à morte, pela via extrínseca, processo denominado de escape imune^{128, 193, 194}.

Na via intrínseca, a galectina-3 tem a capacidade de manter a integridade do potencial elétrico transmembrana mitocondrial, estabilizar o processo de transmissão de elétrons nas cristas da membrana interna e de interagir com proteínas da família do Bcl-2 e impedir a formação de poros^{130, 194}.

Na via extrínseca, a galectina-3 extracelular pode ligar-se a células que possuem receptores de membrana pró-apoptóticos. Os linfócitos T citotóxicos apresentam receptores que são ativáveis pela galectina-3. Ao

ocupar a fenda funcional do receptor, a galectina-3 induz a ativação de segundos mensageiros que ativarão a via final das caspases^{128, 193}.

Células que têm a capacidade de escapar ao reconhecimento por células do sistema imune possuem maior probabilidade de sobreviver nos tecidos, seja no tecido tireóideo, na luz vascular ou em um eventual órgão onde a célula maligna pode se implantar por via hematogênica ou linfática¹⁸³.

2.3.4. ANGIOGÊNESE

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos e linfangiogênese é a formação de neovasos linfáticos. Bem estabelecida é a necessidade dos tecidos neoplásicos de produzir vasos sanguíneos arteriais para suprir seu aporte metabólico e de vasos venosos para drenar seus resíduos. Quanto maior a capacidade do parênquima maligno de induzir a angiogênese, maior seu potencial para progredir em volume e gerar metástase^{184, 195-197}.

O estudo do fenômeno angiogênico das neoplasias é um exemplo de interação entre os marcadores celulares e estromais, pois o tecido maligno ao se proliferar, necessita de maior aporte sanguíneo e produz fatores que estimulam a formação de vasos, ao mesmo tempo em que secreta enzimas que degradam a matriz para que as células neoplásicas possam progredir pelo estroma em direção aos vasos neoformados¹⁹⁸.

Para o estudo do grau de angiogênese pode-se lançar mão de anticorpos que à imunohistoquímica marcam as células endoteliais. O CD-34 (catepsina D-34) é o mais específico para vasos neoformados³⁰.

Em 1988, Srivastava¹⁹⁹ e colaboradores foram os primeiros a relacionarem a presença de metástase com o número de microvasos no melanoma. Weidner²⁰⁰ e colaboradores, em 1992, foram pioneiros no emprego do cálculo da densidade de microvasos (DMV) no estudo do prognóstico do carcinoma de mama.

Fontanini²⁰¹ em 1996, observou que apenas no carcinoma medular a maior DMV foi um fator prognóstico significativo, o que não ocorreu no CBDT. Resultados semelhantes foram encontrados por Friguglietti³² e colaboradores ao analisarem as neoplasias foliculares.

Goldenberg²⁰² e colaboradores, em 1998, apontaram que há elevada DMV no CBDT quando comparada à do tecido tireóideo adjacente, sem correlação com os índices de recorrência da doença. Por outro lado, no mesmo ano, foi demonstrado que a DMV pode ser um fator prognóstico significativo no carcinoma papilífero da tireóide^{203, 204}.

Angiogênese e galectina-3

Nangia-Makker¹⁴¹, em 2000, relacionou a galectina-3 ao fenômeno angiogênico. Demonstrou que a galectina-3 está envolvida na formação de capilares *in vitro* e *in vivo*.

Na literatura investigada não há estudos da associação entre a expressão da galectina-3 e a densidade de microvasos no CBDT.

3. OBJETIVO

3. OBJETIVO

O objetivo da presente pesquisa foi verificar:

3.1. Hipóteses principais

3.1.1. Se no CBDT há diferença da imunoexpressão da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno entre os doentes com e sem metástase;

3.1.2. Se é possível prever o risco individual da ocorrência de metástase no CBDT, em função da quantificação digital da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno.

3.2. Hipóteses secundárias

3.2.1. Se no CBDT a imunoexpressão da galectina-3 nos compartimento do tireócito maligno é diferente daquela no tecido tireóideo não neoplásico;

3.2.2. Se há diferença da imunoexpressão da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno segundo a presença de invasão tecidual local pelo CBDT;

3.2.3. Se há diferença da imunoexpressão da galectina-3 nos compartimentos do tireócito maligno conforme a sobrevivência dos doentes acometidos pelo CBDT;

3.2.4. Se nos grupos com e sem metástase há indícios do envolvimento da galectina-3 com inibição da via intrínseca ou indução da via extrínseca da apoptose; indução da proliferação celular; e indução da angiogênese.

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

O presente estudo teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, protocolo de pesquisa nº 484/02) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10 de julho de 2002 (Apêndice B), e Bolsa de Estudo para Doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

4.1. PESQUISA DOS DADOS DA CASUÍSTICA E DESENHO DO ESTUDO

Em etapa preliminar, foram investigados todos os 774 registros consecutivos de operações cirúrgicas indicadas por doença da glândula tireóide no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia do HC-FMUSP, no período entre 1995 e 1999. Em 506 pacientes foi realizada tireoidectomia ou ressecção de cadeias linfáticas cervicais por carcinoma da glândula tireóide. Sete doentes foram submetidos ao esvaziamento cervical nesse período, porém à tireoidectomia em data anterior a 1995.

Trata-se de estudo retrospectivo, de caso-controle não pareado, longitudinal para a análise do fenômeno metastático e da sobrevivência, transversal para a ocorrência de invasão tecidual local.

Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios gerais de inclusão, considerou-se a confirmação do diagnóstico histológico do tumor primário como CBDT, assim como a disponibilidade dos dados referentes ao tratamento cirúrgico e daqueles necessários para o estadiamento inicial.

Foram excluídos os indivíduos cujos blocos dos espécimes ressecados não possuíam mais área de tecido representativo de carcinoma.

Os doentes foram recrutados para a formação do grupo caso até que foram inteirados 49 com metástase no período perioperatório. O grupo controle foi formado por 60 indivíduos sem doença metastática, recrutados de maneira ajustada pela data da operação para abranger o mesmo período de recrutamento do grupo caso, ambos perfazendo uma casuística de 109 doentes.

Os critérios de inclusão específicos para a formação dos grupos caso e controle foram:

- Grupo caso: o diagnóstico de metástase linfática ou hematogênica pelo exame anátomo-patológico ou pela concentração fora do leito tireóideo do iodo marcado, à pesquisa de corpo inteiro;
- Grupo controle: a ausência de metástase, com base no registro em prontuário, assinalado por cirurgião de cabeça e pescoço, da ausência de sinais e sintomas relativos à doença metastática ou ausência do fenômeno aos exames de imagem.

O critério de exclusão específico para o grupo controle foi a falta de seguimento ambulatorial por mais de cinco anos, o que resultou em um número de 52 doentes nesse grupo. Desses, houve ainda migração para o

grupo caso de oito indivíduos que desenvolveram metástase durante o período de acompanhamento.

Dessa forma, constituiu-se o grupo caso de 57 doentes e o grupo controle de 44.

Revisão de prontuários

A revisão dos prontuários dos doentes com diagnóstico confirmado de carcinoma papilífero e folicular, recuperados da Divisão de Arquivo Médico do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foi feita com a utilização de protocolo previamente estabelecido (Apêndice C) contendo:

- Identificação do doente: gênero, idade no momento do ato operatório e origem étnica;
- Características clínicas pré-operatórias: queixa principal e sua duração; antecedentes pessoais e uso de levotiroxina sódica ou anti tireóideos via oral; características do exame físico relativo à tireóide e região cervical; exames laboratoriais – T4 livre (referência: 0,6 - 1,54 ng/dl), TSH (referência: 0,5 - 4,2 mU/ml), tireoglobulina (referência: inferior a 55 ng/ml) e anticorpos anti tireóideos séricos; exame ultrassonográfico da região cervical e exame citológico do material obtido pela PAAF;
- Dados referentes ao tratamento cirúrgico: data da operação, extensão da tireoidectomia e tipo de esvaziamento cervical realizado;
- Características clínicas pós-operatórias: dados da PCI com iodo marcado (locais e porcentagem de captação em 24h), radioiodoterapia complementar (dose de iodo marcado em mCi e data), quando realizada,

e dose da reposição hormonal (μg); exames laboratoriais – TSH e tireoglobulina séricos;

- Características anátomo-patológicas do carcinoma primário: tipo histológico e subtipos, presença de tireoidite e bócio colóide associados, multicentricidade do carcinoma; características de invasão tecidual – extensão extracapsular, invasão vascular e invasão perineural; diâmetro máximo do maior nódulo de carcinoma;
- Presença de metástase linfática ou hematogênica;
- Seguimento: tempo total de seguimento em meses, ocorrência de óbito e recidiva da doença. Considerou-se persistência a evidência do reaparecimento do carcinoma em menos de seis meses do tratamento cirúrgico e recidiva após esse período;
- Classificação: estadiamento TNM segundo a UICC e classificação segundo o índice prognóstico AMES³⁸.

Foram analisadas quatro dosagens séricas pós-operatórias de TSH e tireoglobulina, fora do período peri-radioiodoterapia. Para apreciar se a dose de levotiroxina sódica administrada no pós-operatório era suficiente, foi considerado o valor do TSH sérico, que deveria ser inferior à metade do valor máximo de referência¹⁸. Quanto à tireoglobulina, foi obtida curva determinada pelos seus valores absolutos e os picos de elevação foram avaliados no seguimento dos doentes. É importante ressaltar que, durante o período de seguimento, houve variação nos valores de referência dos exames. Para tornar possível a comparação dos resultados foi realizado o cálculo da proporção entre os valores obtidos e as respectivas referências.

A coleta dos dados relativos à evolução pós-operatória, que eventualmente não constavam nos prontuários, foi completada através de convocação dos pacientes, comunicação pessoal, visitas domiciliares ou questionários enviados aos familiares, enfocando dados relativos à recidiva ou óbito, para assim obter o seguimento de 60 meses ou mais.

4.2. AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA

Foram obtidos todos os espécimes do carcinoma primário, linfonodos e metástase hematogênica ressecados de cada caso, conservados no setor de arquivo de blocos e lâminas do Serviço de Anatomia-Patológica do Instituto Central do HC-FMUSP.

Todo o material encontrava-se incluído em blocos de parafina tamponada, após fixação prévia em formalina 10%, confeccionados à época da exérese cirúrgica. Cada um deles foi processado primeiramente para diagnóstico histológico e em seguida, os espécimes relativos à glândula tireóide, para o estudo imunohistoquímico.

Cortes histológicos de 3 µm de cada bloco foram montados sobre lâminas e corados por hematoxilina-eosina. Estas foram revistas separadamente por dois patologistas do Departamento de Patologia da FMUSP com experiência na análise de neoplasias tireóideas. Os casos nos quais o diagnóstico foi de carcinoma pouco diferenciado ou medular não foram considerados. Nenhum dos patologistas conhecia previamente o diagnóstico das lâminas estudadas. Apenas foram incluídos no estudo os casos nos quais houve concordância no diagnóstico de CBDT entre eles.

A classificação dos subtipos do carcinoma, segundo os critérios preconizados pela AFIP¹, foi realizada nas áreas mais representativas e com base no padrão tecidual predominante, identificados após análise de todos os cortes.

As lâminas relativas aos linfonodos extraídos, bem como ao fragmento de biópsia da metástase hematogênica, quando realizada, também foram analisados pelos dois patologistas. Da mesma forma, foram incluídos somente os casos nos quais houve a concordância entre eles.

Além disso, para cada caso foi selecionado um bloco de parafina com área representativa do carcinoma e, sempre que possível, da interface entre ele e o tecido normal ou bócio colóide. A partir desses blocos foram confeccionadas as lâminas para a reação imunohistoquímica com os anticorpos anti-galectina-3, anti-Ki-67, anti-caspase-3 ativada e anti-CD-34.

4.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

4.3.1. TÉCNICA DE COLORAÇÃO

Toda as reações para a análise imunohistoquímica foram realizadas no Laboratório de Imunohistoquímica (LIM 05) do Departamento de Patologia da FMUSP.

Os blocos selecionados foram cortados em fragmentos de 3 µm de espessura e estes, montados sobre lâminas de microscopia previamente silanizadas, sem coloração. A silanização das lâminas foi feita da seguinte maneira: imersão em uma cuba contendo álcool, em duas com acetona e

depois em mais duas com silane (Sigma[®] A3648) por cinco minutos cada; o procedimento termina com lavagem em acetona e água destilada.

As lâminas silanizadas contendo o corte histológico de tecido tireóideo foram submetidas à técnica de imunohistoquímica que seguiu o protocolo streptABC – complexo streptavidina-biotina-peroxidase³⁰.

Primeiro o tecido foi desparafinado pela imersão em xilol aquecido a 95°C por 20 minutos, seguido de lavagem em xilol a temperatura ambiente. O tecido foi então hidratado pela imersão das lâminas em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, respectivamente, seguida de lavagem em água corrente, água destilada e deionizada.

Seguiu-se a recuperação antigênica, realizada em panela a vapor na qual colocou-se o berço com as lâminas em cuba com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 a 95-100°C. Após 35 minutos, a cuba com as lâminas foi retirada da panela e permaneceu por 20 minutos em resfriamento até a temperatura ambiente. Seguiu-se com a lavagem em tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,05 M, pH 7,2-7,4. Na sequência, realizou-se o bloqueio das peroxidases endógenas com a lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio 10V (3%), seguida de lavagem em água corrente, água destilada e em PBS.

O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com a imersão das lâminas em leite desnatado 2%, diluído em PBS, por 20 minutos em temperatura ambiente. Logo após, escoou-se o leite.

Os seguintes anticorpos primários foram então diluídos separadamente em soro albumina bovina (BSA, Sigma[®]): anti-galectina-3, na proporção de 1:40 (LabVision[®], California, USA), anti-Ki-67 na proporção de 1:400

(Immunotech[®], Marseille, France), anti-caspase-3 ativada na diluição de 1:600 (clone p20 (N-19) – Santa Cruz Biotechnology Inc[®], California, USA) e anti-CD-34 na diluição de 1:25 (Novocastra Laboratory[®], Newcastle, United Kingdom). Sobre os cortes de tecido foram colocados 100 µl de cada solução resultante (em lâminas distintas) que permaneceram incubados em câmara úmida e em geladeira durante 18 horas.

Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS e em seguida, incubadas por uma hora a 37°C com o anticorpo secundário LSAB-HRP (*Large Streptavidin-Biotin – System Peroxidase*; k-0690; Dako A/S[®], Copenhagen, Denmark), comercializado já pronto para uso. As lâminas foram então lavadas em tampão PBS e incubadas pela peroxidase estreptavidina-biotinilada por 45 minutos a 37°C.

Após a lavagem em PBS, procedeu-se à revelação, na qual as lâminas foram colocadas no cromógeno (3-3'-diaminobenzamida – DAB 100mg em 70 ml de PBS + 3 ml de água oxigenada; Sigma Diagnostics[®], St. Louis, USA), por cinco minutos e lavadas em água corrente, contracoradas em hematoxilina de Harris (Sigma Diagnostics[®], St. Louis, USA) por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente para serem desidratadas pela imersão em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto e em solução de xilol. Finalmente as lâminas foram montadas com lamínula e entelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

Como controle interno negativo foram consideradas hemácias não coradas; como positivo, para galectina-3 e caspase-3, a coloração de macrófagos xantomatosos e linfócitos, respectivamente (Figura 2).

Figura 2 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para galectina-3 em aumento de 400x. Nota-se conglomerado de macrófagos xantomatosos de colorido castanho no citoplasma, representativos do controle interno positivo (caso nº 9).

Como controles externos, positivo e negativo, das reações utilizaram-se: língua humana para galectina-3 e CD-34, amígdala humana para Ki-67 e caspase-3 ativada, segundo especificação dos fabricantes dos anticorpos primários. O controle externo negativo foi submetido a todos os passos do processo, exceto a exposição ao anticorpo primário.

O colorido castanho foi considerado como uma evidência da expressão dos antígenos na célula, para cada anticorpo utilizado (galectina-3, Ki-67, caspase-3 e CD-34), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Fotomicrografia de lâminas coradas por imunohistoquímica em aumento de 400x. (A) Expressão da galectina-3 no nucléolo (seta em vermelho), nucleoplasma (seta em verde) e citoplasma (seta em preto) dos tireócitos malignos; (B) expressão do endoteliócito para CD-34; (C) expressão citoplasmática da caspase-3; (D) expressão nuclear do Ki-67.

4.3.2. QUANTIFICAÇÃO DIGITAL DA IMUNOEXPRESSÃO

Inicialmente, no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse® TS100) sob a mesma intensidade de luz e altura do condensador. A área de maior concentração de células marcadas (*hot spots*), para cada anticorpo, foi escolhida em aumento de 40 e 100x.

Para a captura digital da imagem dos campos microscópicos, em aumento de 400x, foram realizadas fotomicrografias de 640x480 *pixels*, em 15 campos consecutivos e não coincidentes por lâmina, com câmera digital (Nikon Coolpix® 4300) em *zoom* óptico máximo, abertura de condensador F13.4 e tempo de exposição de 1/250, com *flash* desligado.

As imagens obtidas foram transferidas para um computador e analisadas através do Sistema de Processamento e Análise de Imagem ImageLab® (Softium Informática®, São Paulo, Brasil), versão 2.4, calibrado para utilizar a escala em micrômetro (μm).

Para a quantificação da imunexpressão foi realizado o cálculo do índice de positividade (IP), intensidade de expressão (ItE), índice de expressão imunohistoquímico (IE), de acordo com os compartimentos celulares, e a densidade de microvasos (DMV), caso a caso.

Para cada marcador os índices calculados foram:

- galectina-3: IP para as expressões nucleolar e nucleoplasmática; IP, ItE e IE para a expressão citoplasmática;
- Ki-67: IP da expressão nuclear;
- Caspase-3: IP, ItE e IE para a expressão citoplasmática;
- CD-34: cálculo da DMV.

4.3.2.1. CÁLCULO DO ÍNDICE DE POSITIVIDADE (IP)

Os tireócitos malignos com citoplasma positivo e negativo foram manualmente indicados (Figura 4) em cada fotomicrografia digital. Sua contagem foi feita simultaneamente pelo programa ImageLab®, com a

análise de 1000 ou mais tireócitos malignos. Assim determinou-se o total de imagens que devem ser analisadas em cada caso e o índice de positividade (IP) citoplasmático segundo a equação¹⁰⁷:

$$IP = \frac{\text{número de tireócitos malignos com citoplasma positivo}}{\text{número total de tireócitos malignos contados}} \times 100 \rightarrow [\%]$$

Para o cálculo do IP nucleoplasmático da galectina-3, o mesmo procedimento foi empregado.

Os nucléolos positivos para galectina-3 também foram indicados manualmente, nas mesmas fotomicrografias utilizadas para o cálculo do IP citoplasmático, e contados de maneira semelhante. Foram considerados positivos os nucléolos com marcação de uma ou mais zonas. O IP nucleolar foi calculado segundo a equação abaixo, onde o denominador representa o total de fotomicrografias analisadas¹⁰⁷:

$$IP = \frac{\text{número de nucléolos positivos}}{\text{total de campos em grande aumento analisados}} \rightarrow [n/CGA]$$

Para o cálculo do IP do Ki-67 utilizou-se a mesma equação acima.

Figura 4 – Demonstração do uso do ImageLab® na identificação manual de células positivas (pontos brancos) e negativas (pontos pretos) e sua concomitante contagem automática (seta) para o cálculo do IP (caso n^o 75).

4.3.2.2. CÁLCULO DA INTENSIDADE DE EXPRESSÃO (ItE)

A intensidade do colorido castanho expresso no citoplasma foi objetivamente quantificada com o emprego do programa de análise de imagem. Para tanto, delimitou-se manualmente e de maneira aleatória, uma área de $2,87 \mu\text{m}^2$ do citoplasma de 12 tireócitos malignos positivos (três em cada quadrante) para cada fotomicrografia utilizada no cálculo do IP citoplasmático.

Para cada fotomicrografia, a densidade da coloração imunohistoquímica (densidade óptica da cor castanha – DOc) dessas áreas foi calculada automaticamente e representa a média do RGB²⁰⁶ (composição da cor segundo a quantidade das cores vermelha, verde e azul) pela área total selecionada (Figura 5), expressa em unidades ópticas por micrômetro quadrado (uo/ μm^2). A DOc total de cada caso foi obtida pelo cálculo da média das densidades ópticas das imagens estudadas naquele caso, correspondentes ao número mínimo de 1000 tireócitos malignos¹⁰⁹.

O mesmo procedimento foi aplicado para obtenção da densidade em uma área de ausência de tecido (densidade óptica do fundo – DOf), espaço vascular ou interpapilar, de todas as imagens estudadas para a equalização das mesmas (Figura 6)¹⁰⁹.

Os valores de densidade óptica calculados pelo programa compõem uma escala decrescente na qual altos valores correspondem a cores visualmente claras. Isso se deve ao fato de que a cor branca absoluta, que corresponde ao máximo da densidade óptica (3207 uo/ μm^2), é composta pela totalidade de vermelho, verde e azul; e o preto, a ausência delas^{109, 206}.

A equação abaixo foi aplicada para o cálculo da Intensidade de Expressão (ItE) para cada caso, cujos valores compõem uma escala crescente:

$$ItE = \frac{3207}{10} - \left(\frac{3207}{10} \times \frac{\sum DOc}{\sum DOf} \right) \rightarrow [uo/\mu\text{m}^2]$$

Figura 5 – Demonstração do uso do ImageLab®. (A) Determinação manual das 12 áreas de citoplasma corado (quadrados em vermelho); (B) planilha de resultados onde a seta indica a média do RGB pela área total delimitada (caso nº 75).

Figura 6 – Demonstração do uso do ImageLab® na determinação manual da área de ausência de tecido (quadrado em vermelho) e o cálculo de sua densidade (seta) (caso nº 75).

4.3.2.3. CÁLCULO DO ÍNDICE DE EXPRESSÃO (IE)

O índice de expressão imunohistoquímico (IE) representa a intensidade de expressão proporcional à fração de tireócitos malignos positivos¹⁰⁸, segundo a equação:

$$IE = \frac{IP}{100} \times ItE \rightarrow [uo/\mu m^2]$$

4.3.2.4. CÁLCULO DA DENSIDADE DE MICROVASOS (DMV)

A contagem de vasos com endoteliócitos marcados para CD-34 foi feita com o auxílio do programa ImageLab[®]. A densidade de microvasos, que expressa o número de vasos neoformados em relação à área total estudada, definida previamente pelo número de imagens determinadas no cálculo do IP, foi calculada segundo a equação^{107, 200}:

$$DMV = \frac{\text{número de microvasos positivos}}{\text{área total de tecido estudada}} \rightarrow [n/mm^2]$$

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com auxílio do programa Excell em Windows XP (Microsoft Corporation[®], Califórnia, USA).

A escolha das medidas de tendência central e dispersão dos valores que compõem as amostras, assim como dos testes estatísticos para comparação entre as mesmas baseou-se nos tipos de distribuição. As distribuições foram definidas como paramétricas ou não paramétricas segundo o programa estatístico SigmaStat[®] versão 3.0 (SPSS[®] Inc; Ilinois, USA). Para todas as outras análises utilizou-se o programa SPSS[®] versão 13.0 (SPSS[®] Inc; Ilinois, USA).

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável contínua de distribuição paramétrica foram organizados e descritos através da média e do desvio padrão, para as não paramétricas a mediana e amplitude inter

quartis. Para as categorizadas utilizaram-se frequências absolutas e relativas²⁰⁷.

Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais paramétricas, utilizou-se o teste “*t*” de Student, e entre as médias de três ou mais populações a análise de variância (ANOVA) com teste auxiliar de Bonferroni^{208, 209}. Para as populações não paramétricas, a comparação das medianas foi feita pelo teste de Mann-Whitney.

Comparações da frequência de um fenômeno entre grupos de variáveis categorizadas foram realizadas com aplicação do teste exato de Fisher e teste do qui-quadrado de Pearson²⁰⁷. A razão de chances foi utilizada como medida de risco para essas variáveis.

Para a verificação da existência de correlação entre duas variáveis contínuas, utilizou-se o teste de correlação de Pearson^{208, 209}.

4.4.1. PREDIÇÃO DE RISCO INDIVIDUAL

A análise multivariada baseada no modelo de regressão logística em degraus foi empregada para identificar as variáveis independentes preditivas da ocorrência dos eventos binários e definir a magnitude de risco (β) para cada uma delas. O valor do exponencial neperiano de β para um fator de risco é a razão de chances para a ocorrência do evento binário^{104, 210}.

Somente as características clínicas, anátomo-patológicas e os biomarcadores que apresentaram correlação com o fenômeno binário à análise univariada são incluídos na análise multivariada¹⁰⁴.

Para variáveis independentes, a mesma análise foi aplicada para o

estabelecimento da equação que permite o cálculo do risco da ocorrência de um evento binário. A equação é composta pelos valores β de cada variável independente e o valor de uma constante (β_0). O valor da constante permite calcular o risco do fenômeno binário para um indivíduo hipotético que não apresente nenhum dos fatores de risco estudados. A constante representa o risco determinado por variáveis independentes que não foram incluídas no estudo e aquelas que devem ainda ser descobertas¹⁰⁴.

O risco do evento binário para um indivíduo é calculado pela equação¹⁰⁴:

$$\text{Risco do evento binário} = 1/[1+e^{-(\beta_0+\beta_1.x_1+\beta_2.x_2+.....+\beta_n.x_n)}]$$

Onde β_0 é a constante, β_1 é o coeficiente β específico para a variável 1, β_2 é o coeficiente β específico para a variável 2, e assim por diante. Os fatores $x_1, x_2, \dots, x_n$ são os valores medidos das respectivas variáveis para cada indivíduo. E "e" é a constante de Neper.

Quando for possível a obtenção da equação de risco, essa foi representada pela curva logística¹⁰⁴.

Para o cálculo do risco da ocorrência de óbito e recidiva da doença também se aplicou a análise multivariada, por regressão de Cox. As taxas da sobrevivência global e livre de doença para 60 meses de seguimento foram obtidas pelo método de Kaplan-Meier^{208, 209}.

Para todos os testes empregados adotou-se o valor de significância estatística menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$)²¹⁰.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em etapas: descrição e análise da casuística; descrição e análise dos resultados referentes à imunoexpressão dos marcadores teciduais.

Na primeira etapa, além da descrição da casuística global de 109 doentes, realizou-se a comparação dos dados da casuística entre os grupos caso (57 doentes com metástase linfática ou hematogênica) e controle (44 indivíduos sem doença metastática).

Na segunda etapa, inicialmente foi descrito o padrão de expressão encontrado no tecido não neoplásico e no carcinoma, de acordo com os compartimentos celulares. Em seguida realizou-se a apresentação dos resultados da comparação dos índices de imunoexpressão subcelular dos marcadores entre os grupos caso e controle. Por fim foram dispostos os dados da análise desses índices de acordo com as características anátomo-patológicas e com a sobrevivência.

5.1. RESULTADOS DESCRITIVOS RELATIVOS À CASUÍSTICA

Ao considerar a casuística global, a distribuição segundo o gênero revelou que 86,2% (94/109) dos doentes eram do gênero feminino e 13,8% (15/109) do masculino, na proporção de mulheres para homens de 6,3:1.

A média de idade foi de 43,6 anos com desvio padrão de 15,9 e

mediana de 43,0 anos (mínima de 11 anos e máxima de 78 anos).

Em 14,7% (16/109) da casuística não se obteve informação sobre a origem étnica. O grupo restante constitui-se de 79,6% (74/93) de caucasóides e 18,2% (17/93) de mestiços. Houve apenas um negro (1,1%) e um oriental (1,1%).

5.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PRÉ-OPERATÓRIAS

Os dados clínicos pré-operatórios são apresentados no ANEXO B – Tabela A5. Em 98,2% (107/109) dos doentes foi realizada análise do prontuário ou contato pessoal.

As queixas apresentadas foram: presença de nódulo cervical em 43,9% (47/107) dos casos; aumento do volume cervical em 26,2% (28/107); aumento da tireóide em 4,7% (5/107); disfagia ou odinofagia em 11,2% (12/107); disfonia em 2,8% (3/107); dispnéia em 1,9% (3/107); dor em região cervical em um caso (0,9%) e obesidade em outro (0,9%). Nos 7,5% (8/107) que não apresentaram queixa, a doença tireóidea foi um achado em exame de rotina.

A duração da queixa, passível de análise em 80,7% (88/109), variou de um a 480 meses, com média de $50,72 \pm 96,29$ meses.

Quanto aos antecedentes pessoais, 14,9% (16/107) referiram tabagismo ou etilismo e 28,0% (30/107) relataram outros antecedentes como hipertensão arterial, insuficiência coronariana e tratamento cirúrgico de outras regiões. Os 57,0% (61/107) restantes não referiram antecedentes. Não houve menção a antecedente de exposição excessiva à irradiação

ionizante. Três (2,8%) doentes faziam uso de levotiroxina sódica via oral e sete (6,5%), uso de propiltiouracil ou metimazol.

O exame físico da região cervical não evidenciou alterações em 10,2% (11/107) dos casos. Bócio uninodular foi encontrado em 72,0% (77/107), bócio multinodular em 13,1% (14/107), bócio difuso em 4,7% (5/107) e o aumento dos linfonodos cervicais em 20,6% (22/107) das vezes.

As médias da dosagem laboratorial pré-operatória do T4 livre, TSH e tireoglobulina sérica estão dispostas na Tabela 4. O anticorpo anti tireóideo foi dosado em 30,3% (33/109) dos doentes e foi positivo em 9,1% (3/33) desses. O anticorpo anti-tireoglobulina, dosado em 75,2% (82/109) foi positivo em 14,6% (12/82).

Tabela 4 – Média, valores mínimo e máximo da dosagem laboratorial do T4 livre, TSH e tireoglobulina sérica (TGB) no período pré-operatório.

	Média ± DP	Variação	n%
T4 livre	1,13 ± 0,87 ng/dl	0,16 – 7,44 ng/dl	65,1% (71/109)
TSH	3,17 ± 12,70 mcU/ml	0,00 – 105,00 mcU/ml	62,4% (68/109)
TGB	418,01 ± 611,00 ng/ml	0,69 – 2083,33 ng/ml	21,1% (23/109)

n% = porcentagem de casos passíveis de avaliação;
DP = desvio padrão.

Exame ultrassonográfico foi realizado em 58,7% (64/109) e a média do maior diâmetro dos nódulos encontrados foi de 25,28 ± 18,58 mm (de 6 a 125 mm). Observou-se 56,2% (36/64) de nódulos hipoecogênicos, 6,3% (4/64) isoecogênicos, 6,3% (4/64) hiperecogênicos, 1,5% (1/64) anecóico e 23,4% (15/64) nódulos mistos. Em quatro (6,3%) exames não havia especificações quanto à ecogenicidade dos nódulos. Microcalcificações

foram encontradas em 18,8% (12/64), calcificações grosseiras em 15,6% (10/64) e linfonodos cervicais aumentados foram detectados em 17,2% (11/64) dos exames efetuados. A descrição das características circulatórias obtidas pela ultrassonografia com Doppler foi encontrada em apenas um caso.

A punção aspirativa por agulha fina da lesão tireóidea foi realizada em 76,1% (83/109) da casuística e o exame citológico revelou: material compatível com carcinoma papilífero em 54,2% (45/83), padrão folicular em 24,1% (20/83), bócio colóide em 8,4% (7/83) e material não representativo em um caso. Linfonodo cervical com metástase de carcinoma papilífero foi encontrado em 10 casos.

5.1.2. TRATAMENTO CIRÚRGICO

A ressecção cirúrgica foi feita em todos os pacientes do estudo e os dados referentes ao procedimento realizado nos 109 doentes são apresentados no ANEXO B – Tabela A6.

Em 96,3% (105/109) realizou-se tireoidectomia total que, em 17,1% (18/105) foram fruto de totalização em tempos cirúrgicos diferentes. A lobectomia total foi feita em 3,7% (4/109) e em 5,5% (6/109) dos doentes o procedimento cirúrgico incluiu outras estruturas: ressecção do nervo laríngeo inferior acometido pelo carcinoma em dois casos, da veia jugular interna em um, ressecção de músculos pré-tireóideos em outro, um caso de ressecção de carcinoma tireóideo intra-traqueal e a ressecção incompleta em um doente.

Esvaziamento linfático cervical foi efetuado em 41,3% (45/109) dos doentes, dos quais sete foram realizados tardiamente, 24,4% (11/45) limitaram-se ao compartimento central, 57,8% (26/45) incluíram também a cadeia linfática cervical júbulo-carotídea unilateral e 17,8% (8/45) consistiram em disseções bilaterais.

5.1.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PÓS-OPERATÓRAS

Os dados clínicos pós-operatórios são apresentados no ANEXO B – Tabela A6. Em 98,2% (107/109) dos doentes foi possível a análise do prontuário ou contato pessoal.

No período pós-operatório foi realizada PCI com iodo marcado em 87,9% (94/107) dos pacientes e desses em 87,2% (82/94) houve captação residual no leito tireóideo, 8,5% (8/94) captação cervical lateral e 4,3% (4/94) captação em outras regiões: três nos campos pulmonares e uma no mediastino. A média de captação residual no leito tireóideo em 24 horas foi de $1,98 \pm 1,54\%$ (de 0,1% a 7,5%).

A proporção de pacientes que foram tratados por radioiodoterapia complementar foi de 72,9% (78/107) e a média da dose total empregada foi de $204,7 \pm 149,57$ mCi (de 100 a 900 mCi). O tempo médio entre a operação e a realização da radioiodoterapia foi de $18,5 \pm 19,3$ meses (de um a 101 meses).

Radioterapia externa e quimioterapia adjuvante foram administradas a um paciente (0,9%) por ter desenvolvido recidiva inoperável em linfonodo cervical, metástase óssea e já ter recebido 900 mCi de iodo marcado.

A média da dosagem da levotiroxina sódica ministrada aos pacientes no período pós-operatório foi de $157,69 \pm 51,33 \mu\text{g}$ (de 50 a 300 μg).

Em 85,3% (93/109) dos casos foi obtido o resultado da dosagem do TSH sérico pós-operatório e a média foi de $5,85 \pm 15,48 \text{ mIU/ml}$ (de 0,013 a 263,08 mIU/ml). Observou-se que 47,3% (44/93) dos casos analisados apresentaram uma das dosagens do TSH acima da metade do valor máximo de referência.

Curva ascendente ou níveis altos de tireoglobulina sérica ocorreram em 15,9% (17/107) dos casos de tireoidectomia total. Um doente que apresentava tireoglobulina persistente em torno de 40 ng/ml foi tratado por lobectomia total da glândula tireóide.

5.1.4. CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

Os dados referentes às características anátomo-patológicas dos carcinomas são apresentados no ANEXO B – Tabela A7.

O diagnóstico de carcinoma papilífero correspondeu a 89,9% (98/109) da casuística e o carcinoma folicular 10,1% (11/109).

Os subtipos histológicos do carcinoma papilífero foram o padrão clássico em 66,3% (65/98), de células altas em 13,3% (13/98), variante folicular em 19,4% (19/98) e variante esclerosante difusa em 1,0% (1/98).

Os carcinomas classificados como minimamente invasivos constituíram 9,2% (10/109) dos casos e desses oito eram carcinomas foliculares (72,3% dos carcinomas foliculares).

A frequência de bócio colóide e tireoidite associados, de carcinomas

multicêntricos e as características de invasão tecidual constam na Tabela 5.

Tabela 5 – Sinopse da frequência das características anátomo-patológicas associadas ao CBDT.

Característica	Frequência
Bócio colóide	41,3% (45/109)
Tireoidite	26,6% (29/109)
Multicentricidade	56,9% (62/109)
Extensão extratireóidea	43,1% (47/109)
Invasão vascular	19,3% (21/109)
Invasão linfática	4,7% (16/109)
Invasão perineural	8,3% (9/109)

A média do maior diâmetro dos carcinomas estudados foi de $26,6 \pm 22,0$ mm (de um a 120 mm). Os microcarcinomas – menores de 10 mm – corresponderam a 15,6% (17/109) da casuística.

5.1.5. ESTADIAMENTO

Os dados referentes ao estadiamento segundo o TNM (UICC) são apresentados no ANEXO B – Tabela A7.

A distribuição do estadiamento operatório dos 109 casos foi de 59,6% (65/109) de doentes no estágio I, 14,7% (16/109) no II, 22,9% (25/109) no estágio III e 2,8% (3/109) no estágio IV.

Tumor primário (T)

Quanto ao tumor primário em si, 17,4% (19/109) foram classificados como T1, 32,1% (35/109) como T2, 7,3% (8/109) como T3 e 43,1% (47/109) como T4.

Metástase linfática (N)

Metástase linfática foi diagnosticada em 43,1% (47/109) dos doentes no perioperatório. Desses, 11 (23,4%) foram achado do estudo anátomo-patológico em linfonodos peritireóideos, nove (19,2%) foram encontrados em produto de esvaziamento do compartimento central, 19 (40,4%) em cadeia linfática lateral unilateral e oito (17,0%) em cadeias bilaterais. Em dois casos nos quais foi realizado esvaziamento do compartimento central, havia apenas linfonodomegalia reacional não neoplásica.

Durante o acompanhamento pós-operatório, houve 16 casos de recidiva em linfonodos cervicais: sete sofreram esvaziamento cervical tardio e nove receberam radioiodoterapia como tratamento. Uma vez que estes últimos já haviam sido classificados como N positivo, a porcentagem final de doentes com metástase para linfonodos cervicais foi de 49,5% (54/109).

Metástase hematogênica (M)

Metástase hematogênica ocorreu em 4,6% (5/109) da casuística na época do tratamento cirúrgico: três (60,0%) para o campo pulmonar, uma (20,0%) para o mediastino, e uma (20,0%) para o cérebro.

Após o acompanhamento, observou-se que mais nove doentes desenvolveram metástase hematogênica perfazendo o total de 12,8% (14/109). Das metástases hematogênicas tardias quatro foram para pulmão, quatro para mediastino e três para tecido ósseo, sendo que em um mesmo doente houve metástase nessas três regiões.

Todos os doentes que desenvolveram metástase hematogênica foram tratados por radioiodoterapia.

5.1.5.1. TOTAL DE METÁSTASE

Ao final do seguimento, o total de doentes que desenvolveram metástase, quer seja linfática ou hematogênica, foi de 52,3% (57/109) sendo que 43 doentes (39,4%) apresentaram metástase linfática exclusiva, três (2,8%) metástase hematogênica exclusiva e em 11 (10,1%) casos as metástases fizeram-se por via linfática e hematogênica concomitantemente.

O estadiamento final dos casos foi de 57,8% (63/109) no estágio I, 14,7% (16/109) no II, 18,3% (20/109) no estágio III e 9,2% (10/109) no estágio IV.

5.1.6. CLASSIFICAÇÃO AMES

Os dados referentes à classificação segundo o índice prognóstico AMES são apresentados no ANEXO B – Tabela A7.

Ao final do seguimento, 23,9% (26/109) dos doentes pertenciam ao grupo de baixo risco, 50,5% (55/109) ao grupo de risco intermediário e 25,6% (28/109) ao grupo de alto risco.

5.1.7. SEGUIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

Os dados referentes ao seguimento clínico são apresentados no ANEXO B – Tabela A6.

O tempo médio de seguimento dos doentes foi de 73 ± 32 meses (mínimo de zero e máximo de 190 meses).

O seguimento foi maior que 60 meses em 86,2% (94/109) da casuística. Dos 15 casos que foram seguidos por período inferior, sete já apresentavam metástase no momento do tratamento inicial. Os oito casos restantes que não apresentaram metástase foram excluídos do grupo controle para o estudo da comparação entre casos com e sem metástase: em um caso não foi possível contato, um doente evoluiu a óbito correlacionado com o CBDT em um mês após a operação, um caso foi seguido por 13 meses, três casos por 14 meses, um por 15 meses, outro por 40 meses.

Sobrevivência global

A taxa de sobrevivência em 60 meses foi de $95,3 \pm 2,1\%$. A curva de Kaplan-Meier para sobrevivência em 60 meses está representada na Figura 7.

O total de óbitos correlacionados com a doença foi de seis (5,5%) casos e desses quatro (66,7%) ocorreram nos primeiros 24 meses de seguimento. Um doente faleceu um mês após a tentativa de exérese cirúrgica sem a ressecção completa do carcinoma, em conseqüências de complicações associadas à persistência local do carcinoma peritrapeostoma; outro, aos dois meses com metástase cerebral; houve dois óbitos 11 meses após o tratamento inicial, um por metástase pulmonar e outro por invasão extensa de bacia proveniente de metástase óssea; outro doente apresentou recidiva em cadeias linfáticas cervicais 51 meses após a operação e morreu aos 56 meses; e por último, um doente desenvolveu recidiva local 35 meses após o tratamento, comprometimento mediastinal e

compressão de veia cava superior, morreu 156 meses após.

Três (2,8%) doentes morreram de causa cardiovascular com 35, 52 e 62 meses de seguimento.

Figura 7 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência em 60 meses.

Sobrevivência livre de doença

A taxa de sobrevivência livre de doença em 60 meses foi de $77,8 \pm 4,1\%$. A curva de Kaplan-Meier para a sobrevivência livre de doença está representada na Figura 8.

Dos três (2,8%) indivíduos que tiveram persistência da doença: um evoluiu com persistência do carcinoma no leito tireóideo e morreu em um mês de pós-operatório; outro apresentava metástase cerebral (diagnosticada por biópsia) no momento do tratamento cirúrgico da tireóide e evoluiu a óbito

em dois meses; e o último apresentava metástase desde o início e morreu de complicações relacionadas a ela 11 meses após a operação.

Em 20,6% (22/107) dos casos houve recidiva: 72,7% (16/22) em linfonodos cervicais, em 40,9% (9/22) disseminação hematogênica e 18,2% (4/22) no leito tireóideo. Em cinco casos houve recidiva em linfonodos cervicais e metástase hematogênica concomitantes; em dois casos recidiva no leito tireóideo e metástase hematogênica concomitantes. O tempo médio de ocorrência de recidiva foi de 36 ± 23 meses (de 6 a 86 meses) e 54,5% (12/22) dessas ocorreram nos primeiros 24 meses de evolução. Em dois casos a recidiva foi diagnosticada após 60 meses (68 e 86 meses).

Figura 8 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença em 60 meses.

5.2. COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE

A análise dos dados da casuística foi realizada considerando o grupo caso, formado por 57 indivíduos que desenvolveram doença metastática e o grupo controle de 44 doentes sem metástase.

5.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Os dados referentes à comparação das características clínicas entre os grupos de doentes sem metástase e o grupo com doença metastática, quer seja linfática ou hematogênica, são apresentados no ANEXO D - Tabela A9, com os respectivos resultados da análise estatística.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à idade e gênero. Houve menor número de mestiços e maior número de caucasianos no grupo com doença metastática (teste do qui-quadrado de Pearson, $p=0,048$).

A média da duração da queixa principal foi maior no grupo de doentes sem metástase (teste de Mann-Whitney, $p=0,049$), porém não houve diferença entre os grupos quanto ao tipo de queixa, presença de antecedentes pessoais, uso de levotiroxina sódica ou propiltiouracil no pré-operatório.

Quanto ao exame físico, houve maior número de doentes com linfonodos cervicais aumentados no grupo de casos com metástase (teste exato de Fisher, $p=0,0001$).

Os exames complementares pré-operatórios revelaram que houve maior frequência de linfonodomegalia no grupo de doentes com metástase ao exame ultrassonográfico (teste exato de Fisher, $p=0,001$); ao exame citológico pré-operatório, maior frequência de padrão folicular entre os casos sem metástase e de linfonodos positivos no grupo de doentes com metástase (teste do qui-quadrado de Pearson, $p=0,005$).

Quanto às características clínicas pós-operatórias, observou-se que no grupo de doentes com metástase, à PCI, houve maior número de indivíduos com captação cervical lateral e em outras regiões distantes ao leito tireóideo (teste do qui-quadrado de Pearson, $p=0,004$).

Em 43,2% dos casos sem metástase e 100,0% dos doentes que desenvolveram metástase receberam radioiodoterapia complementar (teste exato de Fisher, $p=0,0001$). A média da dose de levotiroxina sódica ministrada após a exérese cirúrgica foi maior entre os doentes com metástase (teste- t de Student, $p=0,044$).

Curva de TGB sérica ascendente no pós-operatório ocorreu em um caso no grupo de doentes sem metástase (teste exato de Fisher, $p=0,001$). As demais características não foram diferentes entre os grupos de maneira estatisticamente significativa.

5.2.2. TRATAMENTO CIRÚRGICO

Não houve diferença quanto à extensão da tireoidectomia realizada entre os grupos (teste do qui-quadrado de Pearson, $p=0,199$). A tireoidectomia total foi realizada em 97,7% (43/44) dos doentes sem

metástase e em 98,3% (56/57) dos casos com doença metastática. Em um caso de cada grupo realizou-se lobectomia total. No doente do grupo caso, a metástase linfática foi diagnosticada na peça operatória da lobectomia.

Em 75,4% (43/57) dos casos com metástase foi realizado esvaziamento linfático cervical e em dois doentes do grupo sem metástase foi efetuado esvaziamento do compartimento central (teste exato de Fisher, $p=0,0001$).

5.2.3. CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

Entre o grupo sem metástase houve 84,1% (37/44) de carcinoma papilífero e 15,9% (7/44) de folicular. Entre os doentes com doença metastática observou-se 96,5% (55/57) de carcinoma papilífero e 3,5% (2/57) de folicular (teste exato de Fisher, $p=0,034$).

As freqüências dos subtipos histológicos do carcinoma papilífero nos grupos com e sem doença metastática estão dispostas na Tabela 6.

Tabela 6 – Comparação da freqüência dos subtipos histológicos do carcinoma papilífero entre os grupos de doentes com e sem metástase.

Carcinoma Papilífero	Grupo	
	Sem metástase	Com metástase
Variante clássica	56,8% (21/37)	78,2% (43/55)
Variante de células altas	13,5% (5/37)	10,9% (6/55)
Variante folicular	29,7% (11/37)	9,1% (5/55)
Variante esclerosante difusa	0,0% (0/37)	1,8% (1/55)

Teste do qui-quadrado de Pearson, $p=0,053$.

A comparação das frequências das características anátomo-patológicas associadas ao CBDT, nos grupos com e sem doença metastática, estão dispostas na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação da frequência das características anátomo-patológicas associadas ao CBDT entre os grupos com e sem metástase.

Característica	Grupo				
anátomo-patológica	Sem metástase		Com metástase		p
Bócio colóide	43,2%	(19/44)	42,1%	(24/57)	0,537
Tireoidite	34,1%	(15/44)	22,8%	(13/57)	0,151
Micro invasão	15,9%	(7/44)	3,5%	(2/57)	0,034*
Multicentricidade	45,5%	(20/44)	68,4%	(39/57)	0,017*
Extensão extratireóidea	22,7%	(10/44)	57,9%	(33/57)	0,0001**
Invasão vascular	15,9%	(7/44)	17,5%	(10/57)	0,523
Invasão linfática	6,8%	(3/44)	17,5%	(10/57)	0,096
Invasão perineural	2,3%	(1/44)	10,5%	(6/57)	0,108

* teste exato de Fisher significante a 0,05; ** significante a 0,01.

A média do diâmetro do maior nódulo de carcinoma no grupo sem metástase foi de $19,69 \pm 15,24$ mm e no grupo de doentes com doença metastática foi de $27,54 \pm 21,63$ mm (teste-*t* de Student, $p=0,035$).

5.2.4. CLASSIFICAÇÃO AMES

Não houve diferença quanto à estratificação em grupos de risco segundo a classificação AMES, dos doentes do grupo controle e do grupo com metástase linfática ao final do seguimento (excluídos os casos com metástase hematogênica) (Tabela 8).

Tabela 8 – Estratificação em grupos de risco segundo a classificação AMES dos doentes do grupo sem metástase e do grupo com metástase linfática.

Grupos de risco AMES	Grupo	
	Sem metástase	Metástase linfática
Baixo risco	25,0% (11/44)	27,9% (12/43)
Risco intermediário	61,4% (27/44)	46,5% (20/43)
Alto risco	13,6% (6/44)	25,6% (11/43)

Teste do qui-quadrado de Pearson, $p=0,280$.

5.2.5. SEGUIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

A média do tempo de seguimento do grupo de doentes sem metástase foi de $72,30 \pm 9,55$ meses (mínimo de 61 e máximo de 94 meses) e do grupo com doença metastática foi de $81,49 \pm 36,43$ meses (mínimo de zero e máximo de 190 meses) (teste- t de Student, $p=0,072$).

Um doente evoluiu a óbito não correlacionado (aos 62 meses) ao CBDT no grupo de casos sem metástase. Nesse grupo não houve óbito correlacionado com a doença. No grupo com metástase 3,5% (2/57) evoluíram a óbito não correlacionado e 8,8% (5/57) a óbito correlacionado (teste do qui-quadrado de Pearson, $p=0,119$). Nesse grupo a sobrevivência global foi de $94,64 \pm 3,01\%$ em cinco anos, o que não foi diferente de maneira estatisticamente significativa do grupo controle (100%) (teste de Breslow, $p=0,071$).

Quanto à sobrevivência livre de doença, no grupo de doentes com metástase diagnosticada no início do acompanhamento, 31,3% (15/48) dos casos evoluíram com recidiva ou persistência da doença ao longo do

seguimento. Dentre os doentes sem evidência de metástase ao início do acompanhamento, a taxa de recidiva foi de 15,4% (8/52) (teste exato de Fisher, $p=0,050$). Sete casos inicialmente N0 desenvolveram metástase linfática ao final do seguimento (13,0% do total de casos com metástase linfática). A sobrevivência livre de doença do grupo controle foi de $86,54 \pm 4,73\%$ em cinco anos e do grupo caso de $70,83 \pm 6,56\%$ (teste de Breslow, $p=0,095$) (Figura 9).

Figura 9 – Comparação das curvas de Kaplan-Meier para sobrevivência livre de doença em 60 meses entre os grupos com e sem metástase no momento do tratamento operatório.

5.3. RESULTADOS RELATIVOS À IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS

5.3.1. RESULTADOS DESCRITIVOS DOS MARCADORES

Os valores obtidos pela quantificação da expressão imunohistoquímica, para cada indivíduo, são mostrados no ANEXO C – Tabela A8.

5.3.1.1. GALECTINA-3 NO TECIDO BENIGNO

Em 73,4% (81/109) dos casos, no corte de tecido utilizado para a reação imunohistoquímica havia simultaneamente área de carcinoma e área de tecido tireóideo normal ou bócio colóide. Regiões de tireoidite associada ocorreram simultaneamente em 21,1% (23/109) dos cortes.

Em nenhum dos 81 casos houve imunexpressão da galectina-3 nos tireócitos da área de tecido são ou de bócio. Mesmo nas áreas de tireoidite associada, as células foliculares (tireócitos) não apresentaram marcação. Em 47,8% dessas (11/23) somente os linfócitos tinham expressão citoplasmática fraca.

5.3.1.2. GALECTINA-3 NO TECIDO MALIGNO

Em 97,3% (106/109) das áreas de CBDT houve imunexpressão da galectina-3 no tireócito maligno.

Tal expressão foi observada nos seguintes compartimentos celulares:

citoplasma, região nucleolar e nucleoplasma (Figura 10).

Os valores da média dos índices de expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3, de acordo com os compartimentos do tireócito maligno, são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Média, valor mínimo e máximo da expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3 no CBDT, segundo os compartimentos do tireócito maligno.

Galectina-3	Média $\pm$ DP	Variação	Negativos
Citoplasmática IP (%)	57,06 $\pm$ 2,82	0,00 – 97,33	2,8% (3/109)
Citoplasmática ItE (uo/ μm^2)	72,37 $\pm$ 2,37	0,00 – 124,75	2,8% (3/109)
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	46,09 $\pm$ 2,84	0,00 – 109,44	2,8% (3/109)
Nucleolar IP (n/CGA)	0,88 $\pm$ 0,18	0,00 – 12,00	61,5% (67/109)
Nucleoplasmática IP (%)	6,98 $\pm$ 0,84	0,00 – 41,65	10,1% (11/109)

DP = desvio padrão; IP = índice de positividade; ItE = intensidade de expressão; IE = índice de expressão; n = frequência; CGA = campos de grande aumento; uo = unidades ópticas.

Houve correlação positiva do índice de positividade, intensidade de expressão e índice de expressão da galectina-3 no citoplasma, e dos índices de expressão dos três compartimentos entre si (ANEXO D - Tabela A10).

Figura 10 – Fotomicrografia de lâmina corada por imunohistoquímica para galectina-3 em aumento de 400x. Nota-se o colorido castanho no citoplasma, nucleoplasma e nucléolo dos tireócitos malignos. Observa-se marcação específica das zonas fibrilar densa e granulosa dos nucléolos (setas vermelhas). (A) caso nº 4 e (B) caso nº 105.

5.3.1.3. Ki-67, CASPASE-3 E CD-34 NO TECIDO MALIGNO

O número de casos sem marcação e valores da média dos índices de expressão imunohistoquímica nuclear do Ki-67, citoplasmática da caspase-3 bem como a média da densidade de microvasos obtidos pela expressão do anticorpo CD-34 são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Média, valor mínimo e máximo da imunoexpressão do Ki-67, caspase-3, densidade de microvasos e número de casos que não apresentaram marcação.

Marcador	Média $\pm$ DP	Variação	Negativos
Ki-67 IP (n/CGA)	1,25 $\pm$ 0,19	0,00 – 16,00	10,1% (11/109)
Caspase-3 IP (%)	19,83 $\pm$ 2,32	0,00 – 90,45	23,8% (26/109)
Caspase-3 ItE (uo/ μm^2)	54,89 $\pm$ 3,10	0,00 – 102,23	23,8% (26/109)
Caspase-3 IE (uo/ μm^2)	14,52 $\pm$ 1,74	0,00 – 74,24	23,8% (26/109)
CD-34 (n/mm ²)	467,09 $\pm$ 20,77	58,31 – 1142,86	0,0% (0/109)

DP = desvio padrão; IP = índice de positividade; ItE = intensidade de expressão; IE = índice de expressão; n = frequência; CGA = campos de grande aumento; uo = unidades ópticas.

5.3.2. MARCADORES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE METÁSTASE

5.3.2.1. GALECTINA-3

A descrição dos valores da média dos índices de expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3 no grupo de doentes sem metástase, de acordo com os compartimentos do tireócito maligno, são mostrados na Tabela 11. Os mesmos valores para o

grupo de indivíduos com doença metastática, quer seja linfática ou hematogênica são mostrados na Tabela 12.

Tabela 11 – Média, valor mínimo e máximo dos índices de expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3 no grupo de doentes sem metástase, segundo os compartimentos do tireócito maligno.

Grupo sem metástase			
Galectina-3	Média ± IC 95%	Variação	Negativos
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	44,27 ± 4,70	0,00 – 96,91	4,5% (2/44)
Nucleolar IP (n/CGA)	0,35 ± 0,13	0,00 – 5,25	75,0% (33/44)
Nucleoplasmática IP (%)	7,25 ± 1,54	0,00 – 41,65	20,5% (9/44)

IC = intervalo de confiança da média; IE = índice de expressão; IP = índice de positividade; uo = unidades ópticas; n = frequência; CGA = campos de grande aumento.

Tabela 12 – Média, valor mínimo e máximo dos índices de expressão imunohistoquímica e número de casos sem marcação pela galectina-3 no grupo de doentes com metástase, linfática ou hematogênica, segundo os compartimentos do tireócito maligno.

Grupo com metástase			
Galectina-3	Média ± IC 95%	Variação	Negativos
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	47,75 ± 3,86	0,59 – 109,44	0,0% (0/57)
Nucleolar IP (n/CGA)	1,40 ± 0,32	0,00 – 12,00	50,9% (29/57)
Nucleoplasmática IP (%)	7,37 ± 1,05	0,00 – 30,37	8,8% (5/57)

IC = intervalo de confiança da média; IE = índice de expressão; IP = índice de positividade; uo = unidades ópticas; n = frequência; CGA = campos de grande aumento.

A comparação das médias do IE citoplasmático da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase, linfática ou hematogênica, é mostrada na Figura 11, do IP nucleolar na Figura 12 e IP nucleoplasmático na Figura 13.

Figura 11 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão (IE) citoplasmática da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase. (teste-*t* de Student, $p=0,566$).

Figura 12 – Gráfico da comparação da média dos índices de positividade (IP) nucleolar da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase. (* teste-*t* de Student, $p=0,004$).

Figura 13 – Gráfico da comparação da média dos índices de positividade (IP) nucleoplasmática da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase. (teste-*t* de Student, $p=0,953$).

A comparação das médias do índice de positividade nucleolar ao serem considerados somente os carcinomas que tiveram expressão nucleolar diferente de zero, revelou: $1,42 \pm 0,14$ nucléolo/CGA no grupo sem metástase e $2,83 \pm 0,54$ nucléolos/CGA no grupo com metástase (teste-*t* de Student, $p=0,042$).

A distribuição do número de doentes dos grupos sem e com metástase, linfática ou hematogênica, em função do índice de positividade nucleolar da galectina-3 está mostrada no ANEXO D - Figura A 1.

Os casos positivos para galectina-3 na região nucleolar foram mais freqüentes entre os doentes com metástase: no grupo controle 25,0% (11/44) e no grupo caso 49,1% (28/57) (teste exato de Fisher, $p=0,011$) (Figura 14).

Figura 14 – Frequência de casos positivos para galectina-3 na região nucleolar nos grupos com e sem metástase (linfática ou hematogênica) (*teste exato de Fisher, $p=0,011$).

A razão de chances para a ocorrência de metástase linfática ou hematogênica quando há expressão nucleolar é de 2,9.

O valor preditivo positivo da imunoexpressão nucleolar da galectina-3 para a presença de metástase, quer seja linfática ou hematogênica foi de 71,8% e o valor preditivo negativo de 53,2%. Sua especificidade para a ocorrência de doença metastática foi de 75,0% e a sensibilidade de 49,1%.

Dos 11 casos com nucléolo positivo para galectina-3 que não apresentaram metástase, 72,7% (8/11) eram carcinomas múltiplos ou apresentavam alguma das características associadas à invasão tecidual local.

Observou-se que nenhum caso de metástase hematogênica exclusiva apresentou positividade nucleolar para a galectina-3.

Ao considerar-se como grupo caso os doentes com metástase linfática exclusiva (excluídos os casos de metástase hematogênica), as médias do índice de positividade nucleolar foram de $1,78 \pm 0,41$ nucléolo/CGA no grupo com metástase linfática exclusiva e de $0,35 \pm 0,13$ nucléolo/CGA no grupo

controle (teste-*t* de Student, $p=0,002$) (Figura 15).

Figura 15 – Gráfico da comparação da média dos índices de positividade nucleolar da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase exclusivamente linfática. (* teste-*t* de Student, $p=0,002$).

Além disso, obteve-se que 58,1% (25/43) dos casos do grupo com metástase linfática apresentaram nucléolo positivo contra 25,0% (11/44) do grupo controle (teste exato de Fisher, $p=0,002$) (Figura 16).

Figura 16 – Frequência de casos positivos para galectina-3 na região nucleolar nos grupos com e sem metástase exclusivamente linfática (*teste exato de Fisher, $p=0,002$).

A razão de chances para a ocorrência de metástase linfática exclusiva quando há positividade nucleolar é de 4,2. O valor preditivo negativo da imunoexpressão nucleolar da galectina-3 para a presença de metástase linfática exclusiva aumentou para 64,7% e a sensibilidade para 58,1%. A acurácia da imunoexpressão nucleolar da galectina-3 para prever a ocorrência de metástase linfática é de 66,7%.

5.3.2.2. Ki-67, CASPASE-3 E CD-34

A comparação das médias dos índices de expressão dos demais marcadores entre os grupos com e sem metástase, linfática ou hematogênica, são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Comparação da média e IC 95% dos índices de imunoexpressão do Ki-67, caspase-3 e densidade de microvasos entre os grupos de doentes sem e com metástase, linfática ou hematogênica.

Marcador	Grupo		p
	Sem metástase	Com metástase	
Ki-67 IP (n/CGA)	1,08 ± 0,37	1,37 ± 0,22	0,507
Caspase-3 IE (uo/ μm^2)	13,66 ± 2,77	15,36 ± 2,47	0,648
CD-34 (n/ mm^2)	459,57 ± 37,16	458,28 ± 22,89	0,977

* teste-*t* de Student significativo a 0,05.

IC = intervalo de confiança; IP = índice de positividade; IE = índice de expressão;
n = frequência; CGA = campos de grande aumento; uo = unidades ópticas.

Observado que havia numericamente angiogênese mais intensa no carcinoma folicular e na variante folicular do carcinoma papilífero, e que esse grupo de carcinomas esteve associado à menor frequência de metástase linfática, foi feita nova comparação da densidade de microvasos entre os

grupos sem metástase e com apenas metástase linfática, após a exclusão dos carcinomas foliculares e carcinomas papilíferos com variante folicular. A média $\pm$ IC 95% da DMV no grupo controle foi de $399,48 \pm 42,54$ microvasos/mm² e no grupo com metástase linfática exclusiva de $481,10 \pm 21,76$ microvasos/mm² (teste-*t* de Student, $p=0,050$).

5.3.2.3. PREDIÇÃO DO RISCO INDIVIDUAL DE METÁSTASE

Ao comparar os grupos com e sem doença metastática à análise multivariada por regressão logística em degraus, obteve-se que o alto índice de positividade nucleolar da galectina-3 e a presença de extensão extratireóidea foram fatores independentes associados à ocorrência de metástase (linfática ou hematogênica) (Tabela 14).

Tabela 14 – Fatores preditivos do risco da ocorrência de metástase (linfática ou hematogênica) no CBDT à análise multivariada por regressão logística.

Fator	β	SE	Exp (β)	IC 95%	p
Extensão extratireóidea	1,465	0,463	4,326	1,75 - 10,72	0,002**
Alto IP galectina-3 nucleolar	0,443	0,230	1,557	0,99 - 2,44	0,054*

* teste de regressão logística em degraus significativo a 0,05; ** significativo a 0,01;
IP = índice de positividade; β = coeficiente de magnitude de risco; SE = erro padrão;
Exp (β) = exponencial neperiano de β ; IC = intervalo de confiança.

Ao ser considerado o grupo de casos com metástase linfática exclusiva observou-se intensificação da associação do alto índice de positividade nucleolar para galectina-3 à ocorrência de metástase linfática (Tabela 15). O baixo índice de positividade nucleoplasmática da galectina-3 foi fator independente associado a esse fenômeno de maneira limítrofe.

Tabela 15 – Fatores preditivos do risco da ocorrência de metástase linfática no CDBT à análise multivariada por regressão logística.

Fator	β	SE	Exp (β)	IC 95%	p
Extensão extratireóidea	1,535	0,529	4,640	1,65 - 13,08	0,004**
Alto IP galectina-3 nucleolar	0,821	0,317	2,272	1,22 - 4,23	0,010*
Baixo IP galectina-3 nuclear	-0,073	0,039	0,930	0,86 - 1,00	0,059

* teste de regressão logística em degraus significativo a 0,05; ** significativo a 0,01;
 IP = índice de positividade; β = coeficiente de magnitude de risco; SE = erro padrão;
 Exp (β) = exponencial neperiano de β ; IC = intervalo de confiança.

A equação logística obtida para o cálculo do risco individual de metástase linfática em função do IP nucleolar da galectina-3 e extensão extratireóidea, com inclusão da constante β_0 de -0,76 foi:

$$\text{Risco} = \frac{1}{1 + \exp\{ -[(-0,76) + (1,54 \text{ se extensão. extratireóidea}) + (0,82 \times \text{IP nucleolar})] \}}$$

A representação gráfica da equação, em função do IP nucleolar da galectina-3 é mostrada na Figura 17.

Figura 17 – Gráfico que representa o risco da ocorrência de metástase linfática em função do índice de positividade (IP) nucleolar da galectina-3.

5.3.2.4. CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES

No grupo de doentes sem metástase (ANEXO D - Tabela A11):

- a) houve correlação positiva entre os índices de expressão da galectina-3 dos três compartimentos celulares;
- b) os índices de positividade nucleoplasmática ou nucleolar não se correlacionaram com o índice de positividade do Ki-67;
- c) o índice de positividade do Ki-67 foi maior quanto maior o índice de positividade da caspase-3;
- d) quanto maior o índice de expressão citoplasmática da galectina-3, maior o índice de expressão da caspase-3.

No grupo com doença metastática (ANEXO D - Tabela A12):

- a) a correlação do índice de positividade nucleolar com os índices dos demais compartimentos deixa de existir;
- b) o índice de positividade nucleoplasmática da galectina-3 passa a apresentar correlação positiva com o índice de positividade do Ki-67;
- c) perde-se a correlação do índice de positividade do Ki-67 com o índice de positividade da caspase-3;
- d) o índice de imunoexpressão citoplasmática da galectina-3 mantém a correlação positiva com o índice de expressão da caspase-3.

Não houve associação da expressão da galectina-3 com a densidade de microvasos em nenhum dos grupos estudados.

5.3.3. GALECTINA-3 E OUTRAS CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS

A média dos índices de imunoexpressão da galectina-3 foi maior no carcinoma papilífero em qualquer dos compartimentos celulares quando comparado ao carcinoma folicular (Tabela 16). Dos três casos que não apresentaram imunoexpressão para a galectina-3, dois eram carcinomas foliculares minimamente invasivos e um microcarcinoma papilífero multicêntrico. À análise multivariada por regressão logística em degraus, o baixo índice de expressão citoplasmática da galectina-3 foi fator independente relacionado ao carcinoma folicular (coeficiente $\beta = -0,97$, $p = 0,048$).

Tabela 16 – Comparação entre as médias e IC 95% dos índices de imunoexpressão da galectina-3 segundo o tipo histológico do CBDT.

Galectina-3	Tipo Histológico		
	Papilífero	Folicular	p
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	48,44 $\pm$ 2,99	25,18 $\pm$ 6,25	0,007*
Nucleolar IP (n/CGA)	0,98 $\pm$ 0,21	0,00 $\pm$ 0,00	0,0001**
Nucleoplasmática IP (%)	7,61 $\pm$ 0,92	1,39 $\pm$ 0,65	0,0001**

* teste-*t* de Student significativa a 0,05; ** significativa a 0,01;
IC = intervalo de confiança; IE = índice de expressão; IP = índice de positividade;
uo = unidades ópticas; n = frequência; CGA = campos de grande aumento.

A variante folicular do carcinoma papilífero apresentou IP nucleoplasmática da galectina-3 menor (média de 2,62 $\pm$ 0,53%) quando comparada ao carcinoma papilífero clássico (9,53 $\pm$ 1,25%) (ANOVA,

$p=0,009$). A variante esclerosante difusa apresentou esse índice em 16,10% (Figura 18). A média dos índices dos demais compartimentos celulares também foram inferiores na variante folicular de maneira não estatisticamente significativa.

Figura 18 – Gráfico da comparação entre as médias dos índices de positividade (IP) nucleoplasmática da galectina-3 segundo o subtipo histológico do carcinoma papilífero. (* ANOVA, $p=0,009$).

Os carcinomas multicêntricos apresentaram maiores índices de imunoexpressão da galectina-3 nos três compartimentos celulares, quando comparados aos carcinomas únicos (Tabela 17 e Figura 19). À análise multivariada, apenas o menor diâmetro associou-se com a presença de doença multicêntrica ($\text{Exp}(\beta)=0,96$, $p=0,031$).

Tabela 17 – Comparação da média e IC 95% dos índices de imunoexpressão da galectina-3 entre os carcinomas únicos e múltiplos.

Galectina-3	Carcinoma		p
	Único	Múltiplo	
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	36,72 $\pm$ 4,67	53,20 $\pm$ 3,28	0,005*
Nucleolar IP (n/CGA)	0,51 $\pm$ 0,16	1,17 $\pm$ 0,39	0,055
Nucleoplasmática IP (%)	5,02 $\pm$ 1,13	8,48 $\pm$ 1,17	0,038*

* teste-*t* de Student significativa a 0,05.

IC = intervalo de confiança; IE = índice de expressão; IP = índice de positividade; uo = unidades ópticas; n = frequência; CGA = campos de grande aumento.

Figura 19 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão (IE) citoplasmática da galectina-3 entre os grupos de carcinomas únicos e múltiplos. (* teste-*t* de Student, $p=0,005$).

Os carcinomas minimamente invasivos apresentaram menor índice de imunoexpressão da galectina-3 no citoplasma e nucleoplasma. Não houve caso de expressão nucleolar nos carcinomas minimamente invasivos (Tabela 18). À análise multivariada nenhum fator correlacionou-se de maneira independente com a presença de micro-invasão.

Tabela 18 – Comparação da média e IC 95% dos índices de imunexpressão da galectina-3 entre os carcinomas minimamente invasivos e os demais.

Galectina-3	Carcinoma		p
	Microinvasivos	Outros	
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	22,61 $\pm$ 6,46	48,60 $\pm$ 2,95	0,011*
Nucleolar IP (n/CGA)	0,00 $\pm$ 0,00	0,96 $\pm$ 0,20	0,0001**
Nucleoplasmática IP (%)	1,45 $\pm$ 0,78	7,53 $\pm$ 0,90	0,0001**

* teste-*t* de Student significativa a 0,05; ** significativa a 0,01;

IC = intervalo de confiança; IE = índice de expressão; IP = índice de positividade; uo = unidades ópticas; n = frequência; CGA = campos de grande aumento.

As médias dos índices de imunexpressão da galectina-3 de acordo com a presença de extensão extratireóidea são mostradas na Tabela 19 e Figura 20. À análise univariada o IE citoplasmático da galectina-3 foi maior nos carcinomas com extensão extratireóidea. À análise multivariada, o diâmetro do maior nódulo de carcinoma (Exp (β)=1,05, p=0,008) e a presença de multicentricidade (Exp (β)=7,37, p=0,001) foram fatores independentes associados à presença de extensão extratireóidea.

Tabela 19 – Comparação da média e IC 95% dos índices de imunexpressão da galectina-3 entre os carcinomas com e sem extensão extratireóidea.

Galectina-3	Extensão extratireóidea		p
	Ausente	Presente	
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	41,06 $\pm$ 3,96	52,74 $\pm$ 3,85	0,037*
Nucleolar IP (n/CGA)	0,76 $\pm$ 0,27	1,05 $\pm$ 0,24	0,423
Nucleoplasmática IP (%)	6,48 $\pm$ 1,17	7,65 $\pm$ 1,18	0,488

* teste-*t* de Student significativa a 0,05; significativa a 0,01;

IC = intervalo de confiança; IE = índice de expressão; IP = índice de positividade; uo = unidades ópticas; n = frequência; CGA = campos de grande aumento.

Figura 20 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão (IE) citoplasmática da galectina-3 entre os grupos de carcinomas com e sem extensão extratireóidea. (* teste-*t* de Student, $p=0,037$).

A média $\pm$ IC 95% do IE citoplasmático da galectina-3 foi maior nos casos com invasão linfática ($61,99 \pm 6,88\%$) quando comparada com a média dos casos sem invasão ($43,36 \pm 3,04\%$) (teste-*t* de Student, $p=0,022$) (Figura 21). À análise multivariada esse foi o único fator independente associado à ocorrência de invasão linfática ($\text{Exp}(\beta)=1,05$, $p=0,013$).

Figura 21 – Gráfico da comparação da média dos índices de expressão (IE) citoplasmática da galectina-3 entre os grupos de carcinomas com e sem invasão linfática. (* teste-*t* de Student, $p=0,022$).

A média $\pm$ IC 95% do IP citoplasmático da galectina-3 foi maior nos casos com invasão perineural ($74,71 \pm 5,82\%$) quando comparada à média dos casos sem invasão ($55,47 \pm 2,98\%$) (teste-*t* de Student, $p=0,012$). À análise multivariada, o fator independente associado à presença de invasão perineural foi o maior diâmetro ($\text{Exp } (\beta)=1,13$, $p=0,010$).

A média $\pm$ IC 95% do IP nucleoplasmático da galectina-3 foi menor nos casos com invasão vascular ($3,0 \pm 1,00\%$) quando comparada com a média dos casos sem invasão ($7,93 \pm 0,99\%$) (teste-*t* de Student, $p=0,001$). À análise multivariada, apenas o maior diâmetro foi fator independente associado à presença de invasão vascular ($\text{Exp } (\beta)=1,06$, $p=0,011$).

Ao considerar o diâmetro do maior nódulo de carcinoma, observou-se que houve correlação inversa com o IP nucleoplasmático da galectina-3 (coeficiente de correlação de Pearson, $r= -0,235$, $p=0,014$).

5.3.4. GALECTINA-3 E SOBREVIVÊNCIA

A comparação das médias dos índices de expressão da galectina-3 de acordo com a evolução para óbito relacionado com o CBDT, no grupo de doentes seguidos por mais de cinco anos (101 casos), são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Comparação entre as médias e IC 95% dos índices de imunoexpressão da galectina-3 segundo a evolução para óbito correlacionado.

Galectina-3	Status		
	Vivo	Óbito correlac.	p
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	44,63 $\pm$ 3,04	54,79 $\pm$ 16,06	0,566
Nucleolar IP (n/CGA)	1,00 $\pm$ 0,21	0,11 $\pm$ 0,13	0,941
Nucleoplasmática IP (%)	7,06 $\pm$ 0,92	9,04 $\pm$ 4,37	0,678

* ANOVA, teste auxiliar de Bonferroni, significativa a 0,05;
correlac. = correlacionado; IC = intervalo de confiança; IE = índice de expressão; n = frequência;
IP = índice de positividade; uo = unidades ópticas; CGA = campos de grande aumento.

À análise multivariada observou-se que a faixa etária mais elevada e a presença de metástase hematogênica foram fatores independentes associados à ocorrência de óbito correlacionado (Tabela 21).

Tabela 21 – Fatores preditivos do risco de morte correlacionada ao CBDT à análise multivariada por regressão de Cox.

Fator	β	SE	Exp (β)	IC 95%	p
Metástase hematogênica	2,483	1,188	11,983	1,17 – 122,9	0,037*
Maior idade	0,078	0,040	1,081	1,00 – 1,17	0,050*

* teste de regressão de Cox significativa a 0,05;
 β = coeficiente de magnitude de risco; SE = erro padrão;
Exp (β) = exponencial neperiano de β ; IC = intervalo de confiança.

As médias dos índices de imunexpressão da galectina-3 de acordo com o desenvolvimento de recidiva ou persistência da doença são mostradas na Tabela 22.

Tabela 22 – Comparação entre as médias e IC 95% dos índices de imunexpressão da galectina-3 segundo a presença de recidiva ou persistência do CBDT.

Galectina-3	Status		p
	Sem recidiva	Com recidiva	
Citoplasmática IE (uo/ μm^2)	45,21 $\pm$ 3,40	50,91 $\pm$ 6,38	0,435
Nucleolar IP (n/CGA)	0,94 $\pm$ 0,24	0,92 $\pm$ 0,33	0,969
Nucleoplasmática IP (%)	7,02 $\pm$ 1,04	8,29 $\pm$ 1,79	0,546

* teste-*t* de Student significativa a 0,05 ;

IC = intervalo de confiança; IE = índice de expressão; IP = índice de positividade;

uo = unidades ópticas; n = frequência; CGA = campos de grande aumento.

À análise multivariada obteve-se que o maior diâmetro foi o fator independente para a ocorrência de recidiva ou persistência da doença (Tabela 23).

Tabela 23 – Fator preditivo do risco da ocorrência de recidiva ou persistência do CBDT à análise multivariada por regressão de Cox.

Fator	β	S.E.	Exp (β)	IC 95%	p
Maior diâmetro	0,028	0,008	1,027	1,02 – 1,05	0,001**

** teste de regressão de Cox significativa a 0,001;

β = coeficiente de magnitude de risco; SE = erro padrão;

Exp (β) = exponencial neperiano de β ; IC = intervalo de confiança.

Dentre os doentes sem diagnóstico de recidiva, cinco casos apresentaram curva ascendente de TGB sérica. Não houve diferença

estatisticamente significativa entre as médias dos índices imunohistoquímicos da galectina-3 entre os doentes: 1) sem recidiva e curva de TGB estável; 2) com recidiva ou curva de TGB ascendente (IE citoplasma, $p=0,87$; IP nucleolar, $p=0,87$, IP núcleo, $p=0,75$).

Houve maior índice de expressão citoplasmática da galectina-3 nos carcinomas que recidivaram no leito tireóideo (média $\pm$ IC 95% de $101,50 \pm 7,94$ $\text{uo}/\mu\text{m}^2$) quando comparado ao índice dos casos sem recidiva (média $\pm$ IC 95% de $44,77 \pm 3,33$ $\text{uo}/\mu\text{m}^2$).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A discussão é apresentada em duas partes. A primeira refere-se ao método empregado e suas limitações. Na segunda parte consideram-se os resultados propriamente ditos.

Quanto aos resultados discutem-se, de forma preliminar, as características clínicas e anátomo-patológicas da casuística geral e dos grupos caso e controle, dado que, para a comparação do padrão e índices de expressão da galectina-3 entre indivíduos com e sem metástase, utilizou-se esse desenho de estudo. Por fim, foram analisados os resultados relativos ao padrão e aos índices de expressão dos marcadores imunohistoquímicos.

6.1. DISCUSSÃO SOBRE O MÉTODO

Escolha do CBDT

O CBDT foi eleito entre os tipos histológicos existentes por ainda haver dificuldade diagnóstica em alguns casos e controvérsia quanto à indicação de esvaziamento linfático cervical eletivo^{10, 52, 75, 91, 96}.

Apesar da presente pesquisa não ter o intuito de avaliar a expressão da galectina-3 nas neoplasias benignas, o estudo de um marcador passível de identificação ao exame citológico pode contribuir com investigações do seu emprego, tanto no diagnóstico pré-operatório do carcinoma como no seu

potencial de desenvolver metástase.

Além disso, uma das causas de controvérsia sobre o papel da galectina-3 como marcador em tumores malignos é a falta de uniformidade quanto ao tipo histológico a ser investigado^{128, 140, 211-214}.

Mesmo se considerado um único órgão, a galectina-3 pode estar ou não presente em seus tecidos. Quando presente, a distribuição celular do marcador e os próprios índices de expressão são específicos para cada tipo histológico¹³⁰. Desse modo, o seu estudo como preditor do fenômeno metastático, exigiria inclusão de dezenas de indivíduos acometidos para cada tipo histológico de carcinoma tireóideo.

Para aumentar a precisão das conclusões, determinou-se que seria incluída nesta pesquisa uma centena de indivíduos acometidos por carcinoma tireóideo, todos do tipo bem diferenciado.

Desenho do estudo

A presença de metástase, linfática ou hematogênica, foi escolhida para a formação do grupo caso por ser um sinal evidente de malignidade. Dessa forma, procurou-se evitar o possível viés de classificação ao definir determinada lesão como benigna ou maligna, mais ou menos agressiva, com base em outros critérios menos objetivos.

O desenho de estudo de caso-controle permite não apenas estimar o risco relativo com base na determinação da razão de chances^{209, 215}, mas também, quando associado a modelos matemáticos de predição de risco, possibilita determinar uma equação para o cálculo do risco da ocorrência de metástase para um determinado indivíduo. O presente estudo obteve essa

equação em função do índice de positividade nucleolar da galectina-3 nos tireócitos malignos.

A incidência de metástase em doentes operados por CBDT, que pode ocorrer anos após a operação, exige que um eventual estudo prospectivo para a análise do fenômeno envolva uma grande casuística, com período de seguimento superior a 10 anos^{9, 216-219}. A análise imunohistoquímica do carcinoma de todos os indivíduos seguidos do grupo sem metástase envolveria centenas de espécimes a serem processados. Tal estudo pode ser realizado, porém fora do contexto do programa de doutoramento.

Técnica de imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi escolhida por ser bem estabelecida e empregada de rotina na prática clínica^{30, 105}, o que torna fácil a aplicação dos resultados obtidos.

A qualidade da reação é fundamental e variações da técnica empregada, sem o cuidado da análise dos controles interno e externo, são motivos de controvérsia na literatura quanto ao papel da galectina-3 no CBDT^{49, 64, 220}.

A galectina-3 está presente no citoplasma do macrófago normal e por esse motivo, a análise de sua imunoexpressão apresenta uma vantagem quanto ao controle da qualidade da reação^{125, 221-223}. A marcação imunohistoquímica dessa célula, na mesma lâmina onde foi analisado o tecido tireóideo, foi o controle interno positivo. Dessa forma, não houve casos falso negativos. Além disso, o controle interno negativo foi obtido pela análise das hemácias, que não devem apresentar qualquer marcação³⁰.

6.1.1. QUANTIFICAÇÃO DIGITAL DA IMUNOEXPRESSÃO

A técnica que considera a imunoeexpressão nos diferentes compartimentos celulares e permite quantificá-la pelo método digital, foi escolhida para a leitura das lâminas no estudo da galectina-3.

A quantificação da expressão imunohistoquímica foi realizada de forma independente para cada um dos compartimentos celulares dos tireócitos malignos e não simplesmente de forma binária “célula positiva” e “célula negativa”, o que é uma das causas de controvérsia sobre o papel da galectina-3 como marcador diagnóstico em tumores malignos^{224, 225}.

Os métodos de análise digital mais comumente empregados baseiam-se em técnicas de subtração de cores da imagem. Dessa forma, todas as estruturas que apresentam o mesmo espectro de cor serão selecionadas^{116, 119, 122}. Na presente pesquisa, para a obtenção da ItE de cada compartimento do tireócito maligno de forma independente, foi fundamental a indicação manual pelo observador da área a ser mensurada.

Outra causa de controvérsia é o emprego do método qualitativo ou semiquantitativo de leitura da imunomarcação. Esses métodos transformam tanto a fração de células positivas quanto a intensidade da imunoeexpressão em variáveis categorizadas. As categorias definidas pelos diversos autores não são uniformes e, além disso, são consideradas faixas de porcentagem de células marcadas com base em valores arbitrários^{108, 124, 226, 227}.

O método empregado no presente estudo baseou-se no conceito de que a transformação de uma variável contínua em categorizada não contribui para a melhor compreensão do fenômeno de expressão

imunohistoquímica. A porcentagem ou a intensidade de expressão mensuradas são variáveis contínuas e o índice de expressão imunohistoquímico, calculado pela multiplicação dos dois fatores (porcentagem e intensidade), torna-se mais fidedigno quando são utilizados os valores brutos obtidos por método quantitativo^{122, 124, 228, 229}.

A utilização do programa de captura e análise digital da imagem determinou um valor numérico à intensidade de imunoexpressão de uma determinada área. Pelo método qualitativo essas áreas são consideradas como coradas de maneira “fraca”, “moderada” ou “forte”¹⁰⁸. De fato, as intensidades de expressão quando extremamente baixas ou altas, não constituem fonte de discórdia entre observadores. Porém, para intensidades intermediárias, o valor numérico substituiu, com vantagem, a qualificação visual da intensidade que poderia ser definida por um observador como “fraca” e por outro como “moderada”, por exemplo. Assim, pela análise quantitativa digital, dois observadores independentes obterão o mesmo valor numérico para a intensidade de expressão de uma mesma área¹²².

Além disso, as variáveis contínuas obtidas foram aplicadas no modelo logístico de predição individual do risco de metástase. Tal modelo deve ser alimentado com valores brutos para que seja preciso, pois a inclusão de dados classificados arbitrariamente diminui a capacidade de predição do evento analisado¹⁰⁴.

6.1.2. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Desenho do estudo

Estudos retrospectivos de caso-controle geram conclusões baseadas em níveis de evidência mais baixos que aqueles obtidos por meio de estudos prospectivos, porém permitem a obtenção de resultados expressivos em prazo factível ao ser considerado o CBDT^{9, 215}.

Viés de recrutamento

O recrutamento dos indivíduos foi feito de forma retrospectiva não pareada e baseou-se estritamente nos critérios de inclusão. Dessa forma um viés pode ter ocorrido quanto a outras características que não estão definidas nesses critérios²¹⁵.

Buscou-se a formação de uma casuística que incluísse por volta de uma centena de indivíduos e aproximadamente 50 doentes acometidos por doença metastática²⁰⁸. Para tanto, foi necessária a consulta de todos os registros das intervenções cirúrgicas sobre a glândula ou ressecção de linfonodos por doença tireóidea do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC-FMUSP, mesmo os referentes a doenças benignas e a outras neoplasias malignas que não o CBDT, operados há mais de cinco anos. A consulta de todos os registros foi uma das formas de minimizar um eventual viés de recrutamento.

Foi curioso notar a alta porcentagem de carcinomas (506/774), o que provavelmente apenas reflete o fato de que a casuística foi recrutada em um hospital quaternário e não interfere nas conclusões obtidas.

Não foram considerados os casos cujos blocos de parafina não estavam disponíveis e foram excluídos os que continham escasso material

histológico, o que pode ter gerado um viés de recrutamento.

Os blocos contendo o CBDT dos doentes com metástase foram requisitados e, se disponíveis, foram incluídos até que fosse formado um grupo de aproximadamente 50 casos consecutivos, o que obrigou a pesquisa de cinco anos de registros. A série histórica²¹⁵ assim formada, exigiu o ajuste do recrutamento dos indivíduos do grupo controle ao longo do mesmo período, no intuito de obter dois grupos homogêneos quanto à época. Uma outra forma de minimizar um viés de recrutamento ao longo do tempo seria um estudo pareado pela data da operação²¹⁵.

Sabe-se que conclusões da análise de eventos que ocorrem em menos de 10% da casuística apresentam baixo poder estatístico^{209, 215}. Dessa forma, os resultados referentes a variáveis de baixa frequência devem ser analisados com cautela. No presente estudo, o carcinoma folicular ocorreu em 10,1% da casuística, o carcinoma minimamente invasivo em 9,2%, metástase hematogênica exclusiva em 2,8%, invasão linfática em 4,7% e perineural em 8,3%. Investigações com número maior de CBDT poderiam caracterizar o papel da galectina-3 nesses casos.

Recuperação de dados clínicos

O estudo retrospectivo oferece menor uniformidade na coleta de dados clínicos²¹⁵.

Todos os prontuários consultados para a formação da casuística apresentavam os dados necessários para as conclusões almejadas. Porém, aqueles que são ilustrativos de alguns fenômenos de relevância clínico-cirúrgica, mas que não interferem de forma direta nos resultados e

conclusões, não puderam ser recuperados de maneira uniforme. Um exemplo são as características ultrassonográficas dos nódulos tireóideos.

Perdas de seguimento

Dois critérios foram respeitados para a inclusão de um doente no grupo sem metástase. O primeiro foi o estadiamento inicial N0 e M0, e o segundo, a ausência de metástase durante o seguimento ambulatorial por mais de cinco anos, na avaliação clínica, laboratorial e nos exames por imagem.

Oito indivíduos sem metástase, que não foram seguidos por esse período, foram excluídos das análises quanto à ocorrência do evento. Esses indivíduos foram considerados no estudo transversal da comparação do padrão de expressão entre tecido benigno e maligno e de acordo com as características de invasão tecidual local, para o qual não foi necessário seguimento.

Para que o fenômeno da perda de seguimento ou de recidiva sob a forma de metástase não resultasse em número insuficiente de indivíduos no grupo sem metástase, o desenho inicial previu maior número de doentes nesse grupo (60/109). Para os cálculos finais, havia 44 indivíduos no grupo controle, pois além das oito exclusões por seguimento insuficiente, oito recidivas implicaram em migração de doentes para o grupo caso, o que resultou em um número final de 57 indivíduos no grupo com metástase.

Não houve exclusão por perda de seguimento no grupo com metástase pois o critério de inclusão nesse grupo é o diagnóstico de doença metastática, independente do período de seguimento.

Diagnóstico de metástase

O diagnóstico de metástase foi dado por meio de sua demonstração anátomo-patológica ou pela presença de tecido captante à cintilografia com iodo marcado, fora do leito tireóideo.

Como limitação do estudo, os seguintes fenômenos devem ser considerados: a presença de micrometástase não evidenciada ao estudo anátomo-patológico e a eventual ocorrência de metástase que não capta o iodo marcado^{4, 230}.

O esvaziamento cervical foi realizado em casos de doença com disseminação linfática comprovada. Dessa forma, existe também o risco de metástase oculta, conforme demonstrado por autores que realizam o esvaziamento cervical sistemático^{7, 11, 25, 81, 231-233}.

Para minimizar tais fenômenos, consideraram-se os doentes com seguimento superior a cinco anos, na tentativa de diagnosticar eventuais metástases que nesse período viessem a apresentar significado clínico.

Metástase após cinco anos

O CBDT pode recidivar na forma de metástase tardia. O período pós-operatório de cinco anos é definido como seguimento mínimo de um indivíduo acometido por carcinoma²³⁴ porém, em casos de CBDT, a metástase linfática ou hematogênica pode se manifestar clinicamente após esse período. Mesmo o tempo de acompanhamento de 10 anos, ainda pode ser insuficiente. Existem relatos esporádicos de evidência de metástase até 30 anos após a operação inicial²¹⁶⁻²¹⁹. Dessa forma, o tempo ideal para seguimento seria de no mínimo 30 anos, o que na prática é algo

extremamente difícil de ser realizado⁹.

Dos 57 casos com metástase deste trabalho, 55 (96,5%) foram diagnosticados antes dos cinco anos de seguimento pós-operatório. Assim, pode-se considerar que o tempo de seguimento superior a cinco anos talvez tenha sido suficiente para minimizar o viés de classificação dos doentes no grupo controle, conforme relatado por outros autores²³⁵⁻²³⁷.

Outra evidência de que no grupo controle provavelmente não houve casos de metástase não diagnosticada é que em 97,7% (43/44) dos doentes a curva de TGB sérica pós-operatória foi estável, mesmo que em 42% desses indivíduos o TSH sérico pós-operatório encontrava-se acima da metade do valor máximo de referência⁴.

Tireócitos malignos que permanecem em linfonodos cervicais por dez anos não devem representar um clone tão agressivo quanto aqueles que se manifestam nos primeiros anos pós-operatórios. Como visto na casuística, 87% (47/54) das metástases linfáticas foram diagnosticadas no momento da operação e 94,4% (51/54) no período de dois anos.

Estudos posteriores que incluam indivíduos cuja metástase se manifeste após o período de cinco anos poderão responder à questão sobre a agressividade dessas colônias celulares de crescimento tardio.

Metástase hematogênica no grupo caso

Para constituição do grupo caso foram considerados indivíduos com metástase. Sua análise evidenciou que nesse grupo as metástases eram tanto linfáticas como hematogênicas.

O número de indivíduos com metástase exclusivamente hematogênica

foi insuficiente para permitir qualquer conclusão quanto ao papel da galectina-3 como marcador preditivo do fenômeno, com nível aceitável de evidência. Para tanto, outras pesquisas deverão ser desenhadas a fim de recrutar um número adequado de casos com metástase exclusivamente hematogênica.

As etapas oncogenéticas que resultam no fenômeno de metástase linfática não são as mesmas que culminam com a hematogênica¹⁹⁸. A análise estatística foi realizada de forma a considerar a diferença biológica entre os dois fenômenos. Também foi estudado um grupo caso contendo indivíduos com metástase linfática exclusiva, com número de eventos que permitiu a obtenção de conclusões.

6.2. RESULTADOS DESCRITIVOS RELATIVOS À CASUÍSTICA

A investigação dos dados da casuística geral foi indispensável para a análise multivariada. A aplicação no modelo logístico de predição do risco individual de metástase permitiu o estudo da relação entre as variáveis consideradas, a fim de identificar aquelas que predizem o fenômeno. O modelo também foi empregado no estudo transversal, para a investigação de outros eventos binários de interesse, por exemplo, a ocorrência ou não de invasão do tecido adjacente ao carcinoma.

Entretanto, os resultados descritivos relativos à casuística geral não têm valor epidemiológico, por serem fruto de um desenho de estudo caso-controle²¹⁵. Dessa forma, a frequência de 52,3% de metástase não representa aquela da população atendida pelo HC-FMUSP.

É apenas curioso notar que a média das idades dos doentes envolvidos é semelhante àsquelas de outros relatos. Por outro lado, a frequência do gênero feminino foi duas vezes maior^{4, 7}.

Houve baixa frequência de indivíduos para os quais a doença tireóidea foi um achado de exames complementares²³⁸, provavelmente por terem sido atendidos em serviço quaternário, para onde os doentes são encaminhados já com queixa específica.

As características clínicas encontradas, classicamente descritas como suspeitas da presença de malignidade⁴ foram: nódulo único em 72% dos casos e, dos 64 laudos recuperados de exame ultrassonográfico, em apenas 56,2% o nódulo era hipoecogênico. As demais características ultrassonográficas não puderam ser avaliadas.

Ao exame citológico foi encontrado “padrão folicular” em 24,1% das PAAF realizadas, semelhante ao resultado descrito por outros autores (15 a 22%)^{4, 16, 22, 71, 72}.

Embora disponível em poucos casos, a média da TGB sérica pré-operatória foi superior ao valor normal de referência. Houve casos de valores excessivamente altos, associados principalmente ao carcinoma folicular e à variante folicular do carcinoma papilífero. Há relatos de que a TGB sérica não parece ser útil no diagnóstico pré-operatório do CBT²³⁹.

Tais resultados mais uma vez indicam a importância da investigação de marcadores que possam auxiliar no diagnóstico do carcinoma tireóideo.

Houve alta frequência de carcinoma multicêntrico e com extensão extratireóidea, características que foram associadas à ocorrência de metástase, o que resultou na alta frequência de casos classificados como T4

na presente casuística.

A sobrevivência global foi semelhante àquela relatada por outros autores^{23, 26, 27, 37, 80}.

6.3. COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE

Para comparar o padrão e índices de expressão da galectina-3 entre os grupos com e sem metástase, utilizou-se o desenho de estudo retrospectivo de caso-controle. Esse tipo de estudo exige que, antes do início de qualquer análise, seja verificado se há discrepância quanto às características clínicas ou anátomo-patológicas entre os dois grupos (ANEXO D - Tabela A9).

Não houve diferença entre os grupos quanto à idade e gênero, fatores descritos como associados ao prognóstico do CBDT^{4, 8, 28, 36}.

Houve diferença entre dois grupos quanto ao grupo étnico declarado no prontuário, mas a qualidade da informação adquirida é questionável, pois a definição de caucasóide ou mestiço é baseada na impressão do funcionário que inicia o prontuário e essa distinção não é possível em todos os casos. Esse fenômeno é compreensível dada à miscigenação da população atendida. Essa característica foi avaliada por haver relatos na literatura de diferença na incidência do CBDT de acordo com a origem étnica e influência dessa no prognóstico da doença²⁴⁰. Por outro lado, não há associação entre origem étnica e ocorrência de metástase⁴, assim, tal diferença não interfere nas conclusões obtidas no presente estudo.

A duração da queixa foi mais curta no grupo de doentes com

metástase, provavelmente por incluir o aumento do volume linfático cervical, que muitas vezes torna-se clinicamente evidente antes do nódulo tireóideo²⁶. O tipo de queixa, os antecedentes pessoais e os achados do exame físico da glândula tireóide não foram capazes de identificar ou prever o acometimento metastático.

A TGB sérica pré-operatória não foi diferente entre os grupos de maneira estatisticamente significativa, embora tenha sido dosada em poucos casos (11 no grupo caso e 10 no grupo controle).

É válido ressaltar que dentre os doentes com metástase linfática, o exame clínico pré-operatório das cadeias linfáticas cervicais estava alterado em apenas 34% (18/53) dos casos. Quando realizada ultrassonografia nesses doentes, em 50% dos exames não foi evidenciada linfonodomegalia e os critérios ultrassonográficos do nódulo tireóideo não foram suficientes para prever o potencial de metástase linfática. Porém, foi avaliado o efeito *Doppler* em apenas um exame.

Mesmo o exame citológico pré-operatório revelou a presença de carcinoma nos linfonodos em apenas 41,2% (7/17) das linfonodomegalias mostradas pela ultrassonografia. Além disso, a palpação intra-operatória das cadeias linfáticas foi considerada normal em sete doentes que evoluíram com metástase linfática tardia. É evidente que o desenho do estudo não permite concluir qualquer dado epidemiológico, apenas é curioso observar que mesmo após a palpação pré e intra-operatória, e o exame ultrassonográfico das cadeias linfáticas, houve casos onde não foi evidenciada a disseminação metastática já existente. Nesses sete indivíduos houve expressão da galectina-3 no epitélio maligno. Para estes doentes, a

análise pré-operatória do marcador poderia indicar o potencial metastático. O fenômeno de metástase linfática remanescente é a causa de discussão quanto à indicação do esvaziamento eletivo das cadeias linfáticas do compartimento cervical central^{5, 13, 18, 76, 81, 87-89, 91, 96}.

Mesmo a estratificação dos doentes em grupos de risco segundo a classificação AMES não foi eficaz para identificar os casos com maior risco de ocorrência de metástase linfática (Tabela 8), conforme encontrado por alguns autores^{40, 41}, o que atesta a necessidade de aprimoramento na determinação do risco de metástase linfática.

Outras diferenças entre os dois grupos foram assinaladas. À PCI houve maior frequência de indivíduos que exibiram captação do iodo marcado em tecidos fora do leito tireóideo no grupo caso, o que é esperado, uma vez que este sinal foi usado como diagnóstico de metástase. Curva ascendente de TGB no pós-operatório ocorreu em 28,8% do grupo com metástase e apenas em um doente do grupo controle, o que sugere a presença de células tireóideas remanescentes em atividade, após a tireoidectomia total, em maior frequência no grupo que desenvolveu doença metastática.

Ainda no pós-operatório, a realização de radioiodoterapia, a média da dose total de iodo marcado empregada, bem como a dose de levotiroxina sódica administrada foram maiores no grupo de doentes que desenvolveram metástase, o que mostra que o diagnóstico de doença metastática interfere na escolha do tratamento pós-operatório.

Houve menor frequência de carcinoma folicular e variante folicular do carcinoma papilífero no grupo de doentes com metástase linfática, o que está de acordo com os dados da literatura^{4, 106}. Dos 10 carcinomas

minimamente invasivos, oito eram foliculares, e dessa forma também foram menos freqüentes nesse grupo.

Presença de multicentricidade, extensão extratireóidea e maior diâmetro do maior nódulo de CBDT foram fatores associados à ocorrência de metástase na análise univariada, o que está de acordo com outros relatos^{4, 8, 37, 39}. Em média, carcinomas com até 2 cm apresentaram menor freqüência de metástase ao passo que aqueles maiores de 3 cm apresentaram maior ocorrência do fenômeno. Dessa forma, é imperativa a realização da análise multivariada para estabelecimento do papel da expressão de um imunomarcador a ser estudado na predição do risco individual de metástase do CBDT.

O tempo de seguimento pós-operatório dos dois grupos foi semelhante e, embora não tenha havido diferença significativa da sobrevivência global entre eles, todos os casos de óbito correlacionado apresentavam doença metastática.

A sobrevivência livre de doença não foi significativamente menor no grupo com metástase, mas a freqüência de recidiva foi maior nesse grupo, o que exigiu novo procedimento terapêutico com piora da qualidade de vida. Além disso, seis casos de óbito correlacionado com o CBDT, quatro desenvolveram recidiva da doença. Tal situação sugere que o diagnóstico do potencial metastático é importante auxiliar para a escolha da terapêutica pós-operatória e estratégia de seguimento. Shaha⁸⁵ e colaboradores, dentre outros autores^{26, 27, 37, 39, 80}, descreveram maior freqüência de recidiva nos casos com metástase linfática, associada à menor probabilidade de cura.

6.4. RESULTADOS RELATIVOS À IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS

O objetivo do presente estudo foi verificar a associação entre a imunoexpressão da galectina-3 e o fenótipo maligno no tecido tireóideo. Para tanto foi comparada a expressão entre tecido benigno e o CBDT; sua expressão subcelular no tireócito maligno de acordo com a presença de metástase e características de invasão tecidual local. Além disso, foi estudada a relação entre a imunoexpressão subcelular da galectina-3 e proteínas envolvidas na progressão maligna, segundo a presença de doença metastática.

6.4.1. GALECTINA-3 NO TECIDO BENIGNO

Não houve imunoexpressão da galectina-3 em qualquer dos 81 epitélios normais ou de bócio colóide analisados nessa pesquisa, em conformidade com a maioria dos relatos anteriores^{29, 34, 49, 52, 60, 64, 149, 241}. Os tireócitos somente apresentaram marcação nos carcinomas.

Tal resultado é uma evidência da associação entre imunoexpressão da galectina-3 e o fenótipo maligno, o que possui duas implicações diretas: sugere sua utilidade no diagnóstico pré-operatório das lesões tireóideas e é o ponto de partida para estudos que investiguem o seu papel na progressão maligna, tanto no desenvolvimento de metástase quanto no processo de invasão tecidual.

A expressão da galectina-3 no tecido normal é “órgão dependente”. Apesar de ter sido identificada em alguns tecidos adultos normais, como

esôfago, estômago, cólon, córnea, conjuntiva, pâncreas, mama, rim ou próstata, a molécula não foi encontrada no tireócito adulto normal^{60, 211-213, 242-246}. Está presente nas células inflamatórias e endoteliais do tecido adulto e no tireócito embrionário^{130, 247}.

A revisão da literatura que aborda a expressão da galectina-3 nos nódulos tireóideos, permite a obtenção de três princípios gerais: 1) lesões benignas não expressam a galectina-3, porém há relatos de marcação fraca e focal, e esse é o principal ponto de controvérsia; 2) o carcinoma papilífero apresenta expressão citoplasmática forte e difusa em todos os casos; 3) o carcinoma folicular expressa galectina-3 no citoplasma em “quase todos os casos”, com padrão de expressão menos intenso que o carcinoma papilífero.

A diferença no padrão de expressão entre lesões benignas e malignas indica a importância de estudos que permitam sua quantificação de maneira objetiva.

Quanto às lesões benignas, as principais causas de controvérsia estão associadas à técnica empregada para o estudo da expressão da galectina-3. A maneira de interpretar a imunoexpressão é uma das causas de resultados controversos. É importante ressaltar que a leitura das lâminas coradas pelo método imunohistoquímico deve ser realizada criteriosamente^{64, 140, 225}. A análise qualitativa que classifica o tecido simplesmente como “positivo” ou “negativo” e não leva em conta quais as células que expressam o marcador, considera como “positivo” o caso onde, em verdade os macrófagos ou as células endoteliais é que estão marcados. Isso é o que ocorre nos estudos que empregam a análise digital com a técnica de subtração de cores^{119, 122}. Essas estruturas não devem ser levadas em conta na avaliação da

expressão de um tecido epitelial^{29, 49, 248}. No presente estudo, quando consideradas as eventuais áreas de tireoidite associada (23/109), houve positividade restrita ao citoplasma dos linfócitos em 47,8% (11/23) dos espécimes, o que ilustra a importância do método seletivo de análise digital empregado.

Outra importante causa de divergência é a escolha da técnica utilizada para detectar a presença da galectina-3. Para a diferenciação entre tecido benigno e maligno, alguns autores lançaram mão de técnicas de amplificação do RNA mensageiro da galectina-3, como o PCR convencional ou de alto débito (*microarray*), métodos que não permitem a leitura seletiva do epitélio^{59, 249, 250}. Caso seja examinado um fragmento contendo células inflamatórias ou endoteliais, haverá amplificação do RNA mensageiro da galectina-3 presente nessas células²⁴⁸. Podem ser utilizados quando associados à microdissecção para a obtenção de apenas tireócitos malignos de espécimes histo ou citológicos, porém, esse não é um procedimento da prática clínica. Dessa forma, a maioria dos autores utiliza a técnica de imunohistoquímica para o estudo da presença da galectina-3.

Outra maneira de solucionar o problema é o PCR quantitativo. Martins⁶⁰ e colaboradores, ao estudarem lesões tireóideas, demonstraram que a quantidade de cópias de RNA mensageiro da galectina-3 obtida pela técnica de PCR quantitativo foi em média vinte vezes maior no CBDT do que na maioria dos tecidos benignos. O trabalho ilustra a importância da análise quantitativa da expressão da galectina-3.

Ainda como causa de divergência pode ser citada a falha em adquirir e processar o tecido a ser analisado. Dois centros ingleses relatam insucesso

no emprego da galectina-3 à imunohistoquímica para o diagnóstico de carcinomas tireóideos no exame citológico. Porém, ambos os grupos relatam baixa porcentagem de recuperação de tireócitos à PAAF (apenas 23,5% das punções)^{250, 251}.

Na presente casuística, houve recuperação de células malignas em 98,8% (82/83) das punções. Quando considerados apenas os grupos que apresentam alta taxa de recuperação de tireócitos malignos, os resultados concordam quanto à utilidade da galectina-3 para diagnóstico pré-operatório dos carcinomas tireóideos²⁵²⁻²⁵⁴.

Ainda sobre a discussão da controvérsia da expressão da galectina-3 em lesões benignas, vale citar que Gasbarri⁵⁸ e colaboradores, em 2004, descrevem que os poucos casos de tireoidite nos quais as células foliculares apresentaram positividade para a galectina-3, também foram positivos para outros marcadores envolvidos na transformação maligna e crescimento desordenado como o HBME-1, c-met e ciclina-D1, além da perda de heterozigose em uma região específica do cromossomo associada a ocorrência de carcinoma. Concluem que esses casos devem ser lesões pré-malignas nas quais há uma resposta imuno-específica a antígenos relacionados ao carcinoma.

Um dos desafios na prática clínica é a diferenciação entre nódulo benigno e maligno ante o diagnóstico citológico de “padrão folicular”^{16-18, 21, 56, 72, 253, 255}. Dos carcinomas estudados, 24,1% (20/83) tiveram “padrão folicular” como resultado do exame citológico. Destes, 95% (19/20) foram positivos para galectina-3 citoplasmática. O presente estudo não tem por objetivo solucionar tal questão. O dado sugere apenas que a galectina-3

pode ser um marcador com importância clínica para o diagnóstico de nódulos malignos. O real papel do marcador no diagnóstico pré-operatório das lesões de padrão folicular somente pode ser determinado em estudos que também incluam indivíduos acometidos por adenoma folicular e outras lesões benignas e que, além disso, quantifiquem a eventual imunexpressão da galectina-3 nessas lesões.

Em 2005, Castro²¹ e colaboradores mostraram que a galectina-3 é específica para os carcinomas e que pode auxiliar, em conjunto com outros critérios diagnósticos, a determinação da conduta ante ao nódulo tireóideo. Nesse mesmo ano, vários autores também demonstraram alto valor preditivo positivo e negativo do uso da galectina-3 à imunohistoquímica em células obtidas por PAAF^{34, 49, 50, 255, 256}.

Quanto ao carcinoma papilífero, no presente estudo houve positividade para a galectina-3 em 98% (97/98) dos casos, o que justifica investigar o significado da expressão do marcador nos diferentes fenômenos relacionados à malignidade nessa neoplasia. Além disso, o único caso negativo foi classificado como microcarcinoma multicêntrico, sem doença metastática.

A frequência de microcarcinoma papilífero em achados de necrópsia varia em torno de 5%, podendo chegar a 36% quando é representada a totalidade da glândula tireóide em cortes histológicos. São comumente multifocais^{65-68, 257}. Em 2003, Ito²⁵⁸ e colaboradores, motivados pela alta prevalência dessas lesões em necrópsias, desenvolveram um estudo prospectivo de 732 indivíduos com diagnóstico de microcarcinoma papilífero ao exame citológico. Desses 162 doentes optaram pelo acompanhamento

clínico e após cinco anos, em 70% deles não houve aumento da lesão, que em algumas vezes até desapareceu. Com isso, os autores questionaram a classificação dessas lesões como malignas e discutem a hipótese de que elas não tenham significado clínico e sejam hiperplasias papilíferas. Talvez o caso da presente pesquisa que não expressou galectina-3 possa pertencer a esse grupo de lesões.

Os outros dois casos que não expressaram a galectina-3 foram classificados como carcinoma folicular minimamente invasivo. Clinicamente, não desenvolveram metástase ou recidiva em cinco anos. Uma hipótese a ser considerada é de que esses casos não sejam necessariamente carcinomas. Estudos discutem a existência de um espectro de lesões foliculares, desde a hiperplasia, adenoma ao carcinoma folicular, que estão em fases diferentes dos múltiplos passos da transformação neoplásica^{1, 252}. Os critérios diagnósticos que os separam, em alguns casos são discutíveis, o que deu origem aos chamados carcinomas bem diferenciados de potencial maligno incerto^{1, 2}.

Além disso, embora haja poucos casos de carcinoma folicular (11/109) na presente pesquisa, esses apresentaram índices de expressão da galectina-3, nos três compartimentos celulares, menores que os casos de carcinoma papilífero, (Tabela 16). Esses achados corroboram a hipótese de que o carcinoma folicular utiliza a galectina-3 de maneira diferente do papilífero na carcinogênese e progressão maligna, o que será discutido mais adiante.

6.4.2. GALECTINA-3 NO TIREÓCITO MALIGNO

Dos 109 carcinomas estudados, 106 apresentaram marcação pela galectina-3. A localização subcelular do marcador variou entre os casos e pôde ser descrita como: nucleolar, nucleoplasmática e citoplasmática.

Os trabalhos mais antigos não consideravam o compartimento celular no qual a galectina-3 estava presente e simplesmente descreviam a célula como “positiva” ou “negativa”. O padrão de expressão e o significado clínico da galectina-3 não é apenas órgão ou tipo histológico dependente²⁵⁹, é compartimento dependente¹⁴⁰.

Se, em alguns tipos histológicos específicos, qualquer localização celular pode denotar o mesmo significado clínico, o fenômeno deve ser verificado, pois em tecido prostático, por exemplo, já foram descritos efeitos opostos dependendo do compartimento onde o marcador está expresso¹⁴⁰. Os resultados da presente pesquisa sugeriram que a galectina-3 está relacionada à capacidade de gerar metástase quando presente no nucléolo e à capacidade de invadir os tecidos adjacentes quando fortemente expressa no citoplasma do tireócito maligno.

A expressão da galectina-3 em mais de um compartimento não é surpreendente, dado que a molécula trafega entre os diversos compartimentos celulares e mesmo no meio extracelular. É produzida no citosol, sem a participação do retículo endoplasmático rugoso. Do citosol, pode ser secretada por uma via que não utiliza o complexo de Golgi, penetrar na mitocôndria, localizar-se em uma sub-região citoplasmática mais periférica ou mais central. Pode migrar para o interior do núcleo e aí trafegar

entre as diversas sub-regiões nucleares^{61, 128, 130}.

As marcações nucleolar e nucleoplasmática podem acompanhar a marcação do citoplasma se a galectina-3 estiver participando dos processos de transcrição, processamento pós-transcricional e maturação do RNA ribossômico e mensageiro. No citoplasma a galectina-3 tem um papel na biogênese e organização das ribonucleoproteínas, e com elas migra para o núcleo para participar das funções nucleares descritas. Todas essas funções são desempenhadas pelo domínio N-terminal da galectina-3, rico em seqüências repetitivas em glicina, prolina e tirosina e, dessa forma, são independentes da ligação da molécula a glicídios^{61, 260}. No presente estudo, encontrou-se correlação positiva dos índices de expressão entre os três compartimentos, ou seja, quando um determinado carcinoma apresentou alto índice citoplasmático, também possuiu altos índices nucleoplasmáticos e nucleolares (ANEXO D - Tabela A10).

Como a galectina-3 desempenha várias funções no interior da célula maligna e cada uma delas é desenvolvida em um compartimento celular específico, deve-se discutir a expressão por compartimento.

6.4.2.1. IMUNOEXPRESSÃO NUCLEOLAR

O nucléolo já foi implicado com a presença de malignidade nas lesões tireóideas desde 1991, quando Montironi conclui que tireócitos com aumento da quantidade e do volume da estrutura são característicos de carcinoma, enquanto os adenomas apresentam tireócitos com poucos ou nenhum nucléolo visível e, quando presentes, menos volumosos¹⁵⁵.

No nucléolo a galectina-3 desempenha funções relacionadas à transcrição do RNA ribossômico, ao processamento pós transcricional (*splicing*) e à maturação tanto deste como do RNA mensageiro ou transportador. Nos carcinomas, todos esses fenômenos estão relacionados à proliferação celular e ao fenótipo maligno^{152, 168, 171, 261}.

Tais fenômenos ocorrem predominantemente nas zonas fibrilar densa e granulosa do nucléolo. Em alguns carcinomas da presente casuística, cujos cortes histológicos foram feitos na região equatorial do nucléolo, houve imunomarcagem específica nessas zonas (Figura 10A).

Foi demonstrado que a galectina-3 somente desloca-se para o nucléolo em células com intensa síntese protéica, pois essas necessitam de ribossomos para que o RNA mensageiro possa ser traduzido¹⁶⁸. O período de maior produção de proteínas de uma célula é o chamado de fase de síntese (fase S), que precede a divisão mitótica. Tecidos com alta atividade proliferativa apresentam alta atividade sintética, nucléolos numerosos e volumosos, onde age a galectina-3. Carcinomas com essas características exibem um comportamento clínico mais agressivo^{159, 262, 263}. A alta porcentagem de células malignas em fase S já foi relatada no carcinoma papilífero da tireóide como um fator independente de pior prognóstico²⁶⁴. Em carcinomas de pâncreas, Kunzli²⁶⁵ e colaboradores encontraram um ligante da galectina-3 na região nucleolar, que quando altamente expresso está associado a pior prognóstico.

Entre os critérios de malignidade estão a capacidade de produzir metástase linfática ou hematogênica, invasão de tecidos adjacentes, como a cápsula da lesão, a parede de vasos e de feixes nervosos

intraneoplásicos¹⁸⁵.

Na presente casuística, a imunoexpressão da galectina-3 no nucléolo esteve relacionada ao fenótipo maligno. O índice de positividade nucleolar da galectina-3 foi maior nos doentes com metástase, o que será discutido mais adiante. Além disso, a expressão nucleolar em carcinomas sem metástase ocorreu em casos que apresentaram outros critérios histológicos de malignidade. Dos 11 indivíduos que não foram acometidos por metástase e o carcinoma exibiu positividade nucleolar, oito apresentavam invasão linfática, perineural, vascular ou extensão extratireóidea. Somente em três dos 42 carcinomas com nucléolo positivo não houve qualquer das características acima descritas. Dois deles exibiam diâmetro de 1 cm e o terceiro de 1,2 cm. Talvez nesses indivíduos, a intervenção cirúrgica precoce tenha evitado a manifestação de fenótipo mais agressivo. A média dos diâmetros dos outros carcinomas com nucléolo positivo, linfonodos negativos, e que apresentaram alguma característica histopatológica de agressividade local foi maior (1,9 cm) que a dos três casos descritos.

Não foi objetivo deste estudo estabelecer uma relação causal entre a galectina-3 nucleolar e maior agressividade do CBDT, mas a maior expressão nucleolar observada entre os carcinomas metastáticos sugere o envolvimento da galectina-3 no processo de progressão neoplásica também nessa casuística.

Não há, na literatura consultada, estudos da imunoexpressão da galectina-3 na região nucleolar do CBDT.

6.4.2.2. IMUNOEXPRESSÃO NUCLEOPLASMÁTICA

O núcleo celular é uma estrutura dinâmica. As moléculas desempenham suas funções nas sub-regiões nucleares ou imersas no nucleoplasma. As mesmas trafegam entre as diversas sub-regiões e a galectina-3 não é exceção^{160, 161, 266}.

A galectina-3 presente no nucleoplasma pode estar exercendo sua função como fator de transcrição, em conjunto com o TTF-1, ou apenas estar trafegando entre as sub-regiões nucleares onde sua função não é totalmente conhecida¹⁶². Toda galectina-3 que está em tráfego entre o nucléolo, os corpúsculos de Cajal, os *Gems*, corpúsculos PML, *speckles* e os *paraspeckles* também será expressa por um padrão nucleoplasmático e não necessariamente desenvolve a função acima descrita¹⁶⁰. Dessa forma, a imunexpressão nucleoplasmática da molécula não permite diferenciar essas duas situações.

O significado do padrão de expressão nucleoplasmático da galectina-3 é controverso e é órgão dependente. Pode ou não estar associada ao fenótipo maligno¹⁵².

Em 1987, Moutsatsos¹³¹ e colaboradores demonstraram que em fibroblastos a localização nucleoplasmática da galectina-3 está associada com proliferação celular de maneira indireta.

Em contrapartida, Em 2000, Honjo²⁶⁷ e colaboradores estudaram 56 espécimes de carcinoma epidermóide de língua e relataram que houve menor imunexpressão nucleoplasmática da galectina-3 ao compará-los com o tecido normal.

Miyazaki²¹³ e colaboradores, em 2002, observaram que em 154 carcinomas gástricos a diminuição da expressão nucleoplasmática está relacionada com malignidade. Em 2004, resultados semelhantes foram relatados em carcinomas prostáticos²¹². Califice¹⁴⁰ demonstrou que a expressão nucleoplasmática correlacionou-se com menor invasão da matriz extracelular, menor taxa de proliferação celular e maior de apoptose.

Shibata²¹¹ em 2005, ao estudar carcinomas de esôfago, observou que a expressão nucleoplasmática estava relacionada à menor frequência de invasão vascular e aos carcinomas bem diferenciados.

No tecido tireóideo, Paron¹⁶² demonstrou em 2003 o papel da galectina-3 atuando imersa no nucleoplasma, em contato direto com fitas de DNA, ativando oncogenes. Resultado semelhante foi encontrado no câncer de mama por Shimura²⁶⁸ em 2004.

Provavelmente, nas lesões malignas, há inicialmente produção citoplasmática, migração para o nucleoplasma onde a galectina-3 irá desenvolver ou não alguma função específica.

Na presente casuística, em 10,1% (11/109) dos carcinomas não houve positividade nucleoplasmática para a galectina-3. O índice de positividade nucleoplasmática não teve associação com características de malignidade, foi semelhante nos carcinomas com e sem extensão extratireóidea, invasão perineural, invasão linfática e metástase.

Além disso, nos casos com metástase linfática exclusiva, houve tendência a menor índice de expressão nucleoplasmática da galectina-3 ($p=0,059$ à análise multivariada). Essa última observação associada com o maior índice de positividade nucleolar nesses casos, favorece a hipótese de

que no CBDT a galectina-3 está em trânsito no nucleoplasma, em direção à região nucleolar. Outro resultado que corrobora essa hipótese é a perda de correlação dos índices de positividade nucleolar com os índices dos demais compartimentos, no grupo de doentes com metástase (ANEXO D – Tabela A12), ou seja, a concentração no nucléolo foi acompanhada de leve diminuição no nucleoplasma.

Um estudo que quantifique a intensidade de expressão nucleoplasmática ou verifique a co-expressão do TTF-1 (fator de transcrição) no CBDT pode contribuir para esclarecer o papel da galectina-3 nesse compartimento.

6.4.2.3. IMUNOEXPRESSÃO CITOPLASMÁTICA

Grande parte dos estudos que analisam a imunoexpressão da galectina-3 considera apenas a marcação citoplasmática, que na maioria dos órgãos está associada ao fenótipo maligno^{205, 211, 224, 269}. Porém, sua associação com o desenvolvimento de metástase é controversa, uma vez que outros fatores celulares ou matriciais interferem nesse processo¹⁴⁹.

A galectina-3 é produzida no citoplasma e nesse compartimento, desenvolve algumas funções: inibe a apoptose pela via intrínseca, participando do crescimento neoplásico; transporta ribonucleoproteínas para o núcleo, o que, em última análise, contribui com o processo de proliferação celular; pode migrar para a superfície celular ou ser excretada para o meio extracelular e assim participar dos mecanismos de adesão celular e escape imunológico^{130, 137}.

No carcinoma de próstata, Califice¹⁴⁰ em 2004 encontrou que a maior expressão citoplasmática da galectina-3 está associada a menor taxa de apoptose, induz a proliferação celular, angiogênese e invasão da matriz extracelular.

Em 2001, foi demonstrado por Moon²⁷⁰ e colaboradores em carcinoma de mama que a expressão citoplasmática da galectina-3 favoreceu a formação de metástase. O mesmo foi demonstrado em 2003 por John¹⁴² e colaboradores. Em 2005, Szoke²⁶⁹, em estudos de carcinoma pulmonar, revelou que a expressão citoplasmática da galectina-3 ocorreu em casos com menor sobrevivência.

Em 1996, Gillenwater²⁷¹ estudou 36 carcinomas epidermóides da região da cabeça e pescoço e encontrou que a expressão da galectina-3 parece estar associada ao grau de diferenciação histológica.

Bergero¹⁸¹ e colaboradores em 2005 estudaram 26 casos de carcinoma de paratireóide e demonstraram que houve imunoexpressão da galectina-3 em 92% das lesões e em 100% dos casos de doença metastática.

Nesse mesmo ano, em carcinomas adenóides císticos da glândula parótida, Teymoortash²⁷² e colaboradores demonstraram maior expressão citoplasmática da galectina-3 nos casos com metástase linfática e hematogênica.

Nas lesões tireóideas a expressão citoplasmática da galectina-3 foi amplamente investigada^{34, 49, 50, 53, 105}. O estudo mais importante é o desenvolvido por um grupo europeu multicêntrico, dirigido por Bartolazzi²⁹ e colaboradores, que já investigou a imunoexpressão citoplasmática da galectina-3 em mais de 1000 lesões tireóideas e demonstraram sua evidente

associação com o fenótipo maligno: é expressa no CBDT e raramente positiva em lesões benignas, conforme discutido anteriormente.

Kawashi⁵³ e colaboradores, em 2000, ao estudar a imunoexpressão citoplasmática da galectina-3 em 177 CBDT, demonstraram a sua associação com a ocorrência de metástase linfática no carcinoma papilífero. O mesmo não foi encontrado por outros autores^{273, 274}.

No presente estudo, não houve diferença entre o índice de expressão citoplasmática da galectina-3 entre os grupos de doentes com e sem metástase, quer seja linfática ou hematogênica. Por outro lado, esse índice foi maior nos carcinomas com as seguintes características que denotam agressividade local: extensão extratireóidea, invasão perineural e linfática, à análise univariada. Embora haja poucos carcinomas com invasão linfática e o risco relativo estimado seja baixo ($\text{Exp } (\beta)=1,05$, $p=0,013$), o alto índice citoplasmático foi o único fator independente associado com essa característica. Provavelmente, como a extensão extratireóidea não foi mensurada²⁷⁵, ou seja, foi considerada apenas como presente ou ausente, a associação dessa característica com o índice de expressão citoplasmática não foi identificada à análise multivariada.

Cvjeic²⁷³ e colaboradores, em 2005, relataram a associação da expressão citoplasmática da galectina-3 com a presença de extensão extratireóidea, em um estudo de 202 carcinomas papilíferos. Não há relatos da análise da imunoexpressão da galectina-3 nos casos de CBDT com invasão linfática ou perineural.

Não foi encontrada associação com a presença de invasão vascular, conforme anteriormente relatado por Maruta²⁷⁴ e colaboradores em 2004.

A disparidade entre os resultados obtidos quando considerados o fenômeno metastático e os de agressividade local, pode ser explicada pelas observações realizadas por Mandriotta¹⁹⁸. Esse autor demonstrou em modelo experimental em camundongos transgênicos que a capacidade de migrar e estabelecer metástase linfática não é conferida pelos mesmos passos carcinogênicos que conferem a capacidade de invadir tecidos adjacentes ou mesmo de gerar metástase hematogênica. Os camundongos com carcinoma pancreático bem diferenciado apresentaram metástase linfática, mas o carcinoma nunca invadia tecidos vizinhos e nunca gerava metástase hematogênica, mesmo os de grande diâmetro.

Também no CBDT, os passos da progressão maligna que conferem a capacidade de estabelecer metástase linfática talvez não sejam os mesmos que conferem capacidade de invasão extratireóidea, perineural, vascular, ou metástase hematogênica. Uma evidência a favor da hipótese é a clássica observação de que o carcinoma folicular tem maior capacidade de gerar metástase hematogênica e o papilífero disseminação linfática^{1, 4}.

A secreção da galectina-3 no meio extracelular, participando dos fenômenos de adesão^{137, 276}, pode ser citada como hipótese na tentativa de explicar a provável associação da alta expressão da galectina-3 citoplasmática com a ocorrência de invasão tecidual local, o que sugere a necessidade de investigações posteriores. A comprovação da ligação entre duas moléculas não é obtida pela simples identificação de ambas no mesmo tecido pela imunohistoquímica, e sim pela demonstração da ligação intermolecular específica. São necessários experimentos especialmente desenhados para estudar a função da galectina-3 na adesão celular, como

aquele desenvolvido em 2006 por Ulmer²⁷⁶ e colaboradores em carcinomas colônicos.

6.4.3. MARCADORES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE METÁSTASE

6.4.3.1. GALECTINA-3 E PREDIÇÃO DO RISCO INDIVIDUAL DE METÁSTASE

Metástase linfática

A média do índice de positividade nucleolar da galectina-3 foi maior no grupo de indivíduos com metástase do que aquela observada no grupo controle.

Quando considerados apenas os indivíduos com metástase linfática exclusiva, a diferença foi ainda mais acentuada (Figura 15). Não há na literatura consultada relatos da investigação da expressão nucleolar da galectina-3 segundo a ocorrência de doença metastática.

A galectina-3 confere à célula maligna algumas características fundamentais para o processo metastático. Para que essa célula migre e se implante em um tecido, é indispensável que seja resistente ao processo de *anoikis*, progrida pela matriz extracelular, sobreviva ao ataque de células do sistema imune na luz dos vasos sanguíneos e linfáticos, reconheça receptores de superfície do leito endotelial do órgão alvo, sobreviva à lesão oxidativa de isquemia e reperfusão da microvasculatura obstruída temporariamente pelo êmbolo metastático, e por fim, prolifere no tecido²⁷⁷. A galectina-3 já foi implicada com todos esses processos^{194, 270}.

É claro que a galectina-3 não é o único fator que determina a capacidade de uma célula desencadear o processo de metástase linfática e nem o sucesso do fenômeno, muito outros fatores estão envolvidos nesse complexo processo. Se alguns tireócitos eventualmente adquiriram a capacidade de estabelecer metástase linfática utilizando, entre outros passos, as funções nucleolares da molécula, existem outras células que estabeleceram colônias linfáticas que não expressam o marcador. Nesses casos, outros processos devem ter conferido tal capacidade a estes tireócitos.

O exposto sugere a importância da galectina-3 somente quando presente, sendo uma evidência de malignidade e potencial metastático. Quando o nucléolo do tireócito maligno não expressa o marcador, outros critérios devem ser estudados como fatores prognósticos para metástase linfática. Isso explica a discrepância, na presente pesquisa, entre o valor preditivo positivo e negativo da imunoexpressão nucleolar do marcador. Outros marcadores protéicos ou baseados na análise do RNA mensageiro certamente serão estabelecidos e poderão ser utilizados nesses casos.

O fenômeno de expressão nucleolar tem importância clínico-cirúrgica. Quando o cirurgião realiza a tireoidectomia para o tratamento do CBDT, é realizado o chamado esvaziamento cervical por necessidade. O esvaziamento linfático por princípio, realizado em muitos serviços japoneses e europeus^{81, 90-92}, não é preconizado em nosso meio⁹.

Se for verdade que não se deve deixar de oferecer o esvaziamento linfático cervical aos indivíduos operados por CBDT com potencial metastático, também é verdadeiro que o ideal é não submeter o doente à

manipulação cirúrgica sem indicação terapêutica. Só é possível definir se o esvaziamento é necessário para um dado indivíduo se houver critérios satisfatórios que predigam o risco de metástase linfática. Até o estabelecimento na prática clínica de outros métodos preditivos, a análise da imunoexpressão nucleolar da galectina-3 no CBDT, principalmente no carcinoma papilífero, pode ser um método auxiliar aos atualmente utilizados.

Na presente pesquisa, dos sete casos inicialmente N0 que ao longo do seguimento desenvolveram metástase linfática cervical, quatro apresentavam nucléolo positivo para galectina-3 (ANEXO C – Tabela A8, casos número 7, 35, 50 e 53), com alto índice de positividade, acima da média do grupo controle. Além disso, os dois pacientes que sofreram esvaziamento do compartimento central cervical e finalmente foram classificados como N0, o carcinoma não apresentou nucléolos positivos.

Obteve-se que a imunoexpressão nucleolar da galectina-3 determina um risco relativo aproximado, baseado na razão de chances, quatro vezes maior para o desenvolvimento de metástase linfática em relação ao carcinoma sem marcação (Figura 16), com alto valor preditivo positivo e especificidade.

À análise multivariada, a IP nucleolar foi fator independente associado à ocorrência principalmente de metástase linfática cervical, o que permitiu a obtenção da equação para o cálculo do risco individual da ocorrência do evento. A presença de extensão extratireóidea também foi fator independente, mas é uma característica raramente demonstrada no pré-operatório.

Segundo esta equação, baseada no modelo de regressão logística,

quando o carcinoma exhibe acima de quatro nucléolos por CGA marcados pela galectina-3, o risco de metástase linfática cervical tende a 100%. Todos os indivíduos que tiveram o CBDT com índice de positividade nucleolar maior ou igual a 4 nucléolos/CGA desenvolveram metástase linfática, à exceção de um doente com carcinoma papilífero de 11 milímetros, mas com extensão extratireóidea.

Metástase hematogênica

Não foi possível avaliar o comportamento da galectina-3 no grupo de doentes com metástase hematogênica exclusiva. O número escasso de doentes não permitiu qualquer conclusão baseada em um nível de evidência aceitável. É apenas curioso notar que nenhum desses três carcinomas apresentou nucléolo marcado pela galectina-3.

Não há relatos na literatura consultada da análise da imunoexpressão da galectina-3 e a ocorrência de metástase hematogênica.

6.4.3.2. CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES

A galectina-3 já foi implicada em diversos processos que conferem características de malignidade à célula neoplásica. Entre eles, resistência à apoptose, estímulo à proliferação celular e angiogênese^{131, 141, 224, 278, 279}. Com intuito de verificar a associação entre o índice de expressão imunohistoquímica da galectina-3 e marcadores envolvidos nesses processos, foram estudadas as expressões da caspase-3 ativada, do Ki-67 e a densidade de microvasos nos grupos de doentes com e sem metástase.

Os índices de expressão da caspase-3 e do Ki-67 foram semelhantes entre os grupos, o que sugere que esses marcadores não são úteis para determinar o potencial metastático do CBDT, conforme a literatura¹⁷⁹.

Quanto ao CD-34, obteve-se que a alta densidade de microvasos está principalmente associada ao carcinoma folicular e à variante folicular do carcinoma papilífero, o que já foi discutido em publicação anterior⁵¹. Apenas no carcinoma papilífero clássico houve maior densidade de microvasos nos carcinomas metastáticos, conforme outros relatos^{203, 204}.

Encontrou-se também que no grupo de doentes sem metástase, quanto maior o índice de positividade do Ki-67, maior o índice de expressão da caspase-3. O alto grau de diferenciação dos carcinomas estudados é condizente com o achado, pois células bem diferenciadas conservam a capacidade de desencadear o processo apoptótico ante o aumento da proliferação celular¹⁸³. No grupo de casos com doença metastática houve perda desse balanço, sugerindo a diminuição do controle celular nesses casos.

Ki-67

O Ki-67 é um marcador nuclear específico de células em proliferação³⁰. Dessa forma, foi escolhido para verificar a associação da expressão da galectina-3 nucleolar ou nucleoplasmática com a proliferação celular dos carcinomas estudados.

Apenas no grupo com metástase o índice de positividade nucleoplasmática da galectina-3 foi diretamente proporcional ao índice de positividade do Ki-67, o que sugere uma possível participação da molécula

no processo proliferativo desses carcinomas. Conforme discutido anteriormente neste trabalho, um passo subsequente pode ser a concentração da galectina-3 na região nucleolar e o desenvolvimento de metástase.

Nos carcinomas do grupo de doentes sem metástase, não se observou o aumento proporcional dos dois marcadores. O mesmo foi encontrado em um estudo de 193 adenocarcinomas de estômago por Baldus¹⁷⁹ e colaboradores em 2000.

O papel da galectina-3 nuclear na indução de proliferação foi demonstrado *in vitro* em várias linhagens de células humanas: de carcinoma tireóideo, mamário e leucêmicas^{138, 162, 280}.

Em carcinomas de próstata o fenômeno é controverso. Foi demonstrado tanto a diminuição quanto o aumento da proliferação celular com a presença da galectina-3 no nucleoplasma^{131, 140}. Em carcinoma epidermóide da região da cabeça e pescoço, obteve-se correlação inversa entre a expressão da galectina-3 e do Ki-67¹⁸².

Cvejic e colaboradores, ao estudar o carcinoma papilífero de tireóide, observaram que não houve associação entre o PCNA e a expressão da galectina-3 no compartimento.

Caspase-3 ativada

A ação anti-apoptótica da galectina-3 citoplasmática é bem estabelecida em modelos experimentais de carcinoma de mama^{194, 278, 281}.

A caspase-3 ativada é o fator final da apoptose e é expressa no citoplasma de células que desencadearam o processo, tanto pela via

intrínseca como pela extrínseca¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Esse foi o motivo da escolha desse marcador em detrimento das outras moléculas que compõem essa via.

No presente estudo, o índice de expressão da caspase-3 aumentou de maneira diretamente proporcional ao índice de expressão citoplasmática da galectina-3 nos grupos de doentes com e sem metástase. Ao invés de associar-se ao efeito anti-apoptótico, a proteína no citoplasma dos tireócitos malignos associou-se a um provável efeito pró-apoptótico. Se houvesse correlação negativa entre os dois marcadores, haveria uma sugestão de que a galectina-3 nos carcinomas estudados estaria bloqueando a via intrínseca da apoptose.

Outras hipóteses podem ser aventadas na tentativa de explicar o achado. O envolvimento da galectina-3 no fenômeno de apoptose induzido pela via extrínseca já foi descrito no mecanismo de escape imune. A célula maligna induz os linfócitos T à apoptose por intermédio da galectina-3, secretada no meio extra celular²⁸².

Um estudo desenvolvido em linhagens de células de carcinoma de mama, demonstrou que as células com galectina-3 expressa no citoplasma eram sensíveis à apoptose induzida pelo receptor TRAIL¹⁹³. Tal receptor está presente na superfície de tireócitos malignos²⁸³. É o único da família de receptores indutores de apoptose que tem a capacidade de desencadear o processo pela via extrínseca no carcinoma tireóideo¹⁹¹.

Nos CBDT estudados, que expressam a galectina-3 no citoplasma, a apoptose pode estar sendo induzida pela via extrínseca por meio da ativação do receptor TRAIL.

Densidade de microvasos (CD-34)

Uma das possíveis funções da galectina-3 na progressão maligna é a indução de angiogênese no estroma neoplásico^{141, 279}. Estudos prévios sugerem a associação da intensa angiogênese com alguns tipos histológicos de carcinoma tireóideo e a ocorrência de metástase^{32, 51, 201, 202}.

Na presente pesquisa, não houve correlação entre o índice de expressão da galectina-3 e a densidade de microvasos. A correlação positiva sugeriria um papel pró-angiogênico da galectina-3 nesses carcinomas.

Nangia-Makker¹⁴¹ e colaboradores, em 2000, relacionaram a galectina-3 ao fenômeno angiogênico em estudos experimentais. O mesmo foi encontrado por Fukushi²⁷⁹ e colaboradores em 2004.

6.4.4. GALECTINA-3 E OUTRAS CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

Tipo histológico

Na presente pesquisa, todos os índices de imunoexpressão da galectina-3 foram menores no carcinoma folicular, quando comparados aos do carcinoma papilífero. O mesmo foi observado por outros autores^{50, 52, 64}. A única associação com o carcinoma folicular, à análise multivariada, foi o baixo índice de expressão citoplasmática da galectina-3. Além disso, nenhum carcinoma folicular apresentou nucléolo positivo.

O carcinoma folicular utiliza a galectina-3 em sua oncogênese de maneira diferente do carcinoma papilífero^{157, 284}.

O maior índice de expressão entre os carcinomas papilíferos indica a participação da molécula de forma mais intensa no seu processo de carcinogênese. Corroborando a hipótese, em 2004, Kurihara¹⁵⁷ e colaboradores demonstraram que a galectina-3 participa da via das β -cateninas no carcinoma papilífero da tireóide, mas não no carcinoma folicular. A ligação direta da galectina-3 à β -catenina estabelece a formação de um dímero protéico que se liga a fatores de transcrição nucleares. O complexo formado liga-se às fitas de DNA dos genes codificadores do c-myc e da ciclina-D1, e induzem a progressão maligna²⁸⁵.

Na presente pesquisa, obteve-se que no carcinoma papilífero a galectina-3 foi um marcador associado à agressividade local e metástase, de acordo com o compartimento celular onde está expressa. Porém, estudos que avaliaram a expressão da proteína no carcinoma anaplásico por exemplo, demonstram que este expressa muito pouco, ou não expressa o marcador, e concluem que a menor expressão está associada à maior agressividade²²⁵. Provavelmente, a galectina-3 apenas não participe da oncogênese do carcinoma anaplásico.

O fenômeno é relevante, pois contribui com a hipótese de que existem marcadores que estão relacionados à carcinogênese de uma determinada entidade nosológica, e que não estão envolvidos na oncogênese de outros subtipos neoplásicos^{43, 44, 259}.

Em carcinoma gástrico, Miyazaki²¹³ e colaboradores, em 2002, demonstraram que no adenocarcinoma indiferenciado a galectina-3 participa do processo oncogenético em doentes com metástase linfática e que não é marcador desse fenômeno quando analisados outros tipos histológicos. Se

comparado com a expressão de uma lesão menos agressiva, o marcador de “adenocarcinoma gástrico indiferenciado” poderá ser erroneamente interpretado como um marcador de pior prognóstico.

Ainda que considerado apenas o CBDT como tentativa de uniformizar a amostra da presente pesquisa, a diferença do padrão de expressão entre os dois tipos histológicos sugere a importância de estudos que os considerem separadamente, com número representativo de cada um deles.

Carcinoma minimamente invasivo

Os carcinomas minimamente invasivos também apresentaram menor índice de expressão da galectina-3 no citoplasma e nucleoplasma, provavelmente por serem, em sua maioria, do tipo histológico folicular (Tabela 18).

Subtipo histológico do carcinoma papilífero

A variante folicular apresentou menor índice de positividade nucleoplasmática que a variante clássica, o que remete à discussão sobre sua semelhança com o carcinoma folicular². Essa similaridade também foi sugerida pela análise da densidade de microvasos conforme discutido anteriormente⁵¹.

Apenas com o intuito de ilustrar a discussão sobre a provável diversidade de passos oncogenéticos específicos de cada tipo e subtipo histológico, é curioso notar que o único caso de variante esclerosante difusa do carcinoma papilífero, localmente mais agressivo e com metástase linfática, apresentou alta expressão citoplasmática da galectina-3 (84,11

uo/ μm^2), alta expressão nucleoplasmática (16,1%), associadas à ausência de expressão nucleolar.

Diâmetro do carcinoma

Obteve-se que o diâmetro do carcinoma foi o fator independente associado com características de invasão tecidual local e à análise univariada, com a ocorrência de metástase. Observou-se também que quanto maior o diâmetro do carcinoma, menor o índice de positividade nucleoplasmático da galectina-3. Tal achado sugere mais uma vez que o baixo índice de expressão nucleoplasmática pode estar associado ao fenótipo maligno.

Multicentricidade

O alto índice de expressão citoplasmática da galectina-3 (acima de 50 uo/ μm^2) associou-se com os carcinomas multicêntricos, à análise univariada. A relação desse índice com a ocorrência de multicentricidade e invasão tecidual sugere o desenvolvimento de estudos que demonstrem sua aplicação na detecção dos casos nos quais a tireoidectomia total se faz obrigatória.

6.4.5. GALECTINA-3 E SOBREVIVÊNCIA

No carcinoma de mama a expressão citoplasmática e nuclear da galectina-3 esteve associada à menor sobrevivência^{270, 286}. O mesmo foi demonstrado em carcinomas de pulmão localmente avançados, carcinomas

de faringe e outros órgãos^{140, 146, 182, 269}. Em contrapartida, no carcinoma epidermóide de laringe, a ausência da expressão da galectina-3 é um fator independente associado ao pior prognóstico^{145, 147}. Shibata²¹¹, em 2005, não encontrou associação da imunoexpressão da galectina-3 com a sobrevivência no carcinoma de esôfago.

No presente estudo, não houve associação da imunoexpressão da galectina-3, em qualquer dos três compartimentos celulares estudados, e a evolução para óbito correlacionado. Estudos envolvendo maior número de casos representativos do fenômeno são necessários. À análise multivariada, os fatores independentes associados ao evento foram a idade elevada e a presença de metástase hematogênica, conforme relatos anteriores^{4, 37}.

Também não houve associação da imunoexpressão da galectina-3 com o desenvolvimento de recidiva ou persistência da doença. Interessante notar foi o maior índice de expressão citoplasmática nos casos com recidiva no leito tireóideo, que sugere mais uma vez sua associação com carcinomas localmente agressivos.

No adenocarcinoma de pulmão avançado, a alta expressão da galectina-3 foi associada à menor sobrevivência livre de doença²⁸⁷. O mesmo foi observado em carcinoma epidermóide de língua²⁶⁷.

6.5. APLICAÇÃO CLÍNICO-CIRÚRGICA DOS RESULTADOS

Embora seja necessária sua validação externa, os resultados da presente pesquisa permitem algumas reflexões referentes à aplicação da galectina-3 como marcador na prática clínico-cirúrgica.

Dado que a galectina-3 não foi expressa pelo tecido normal ou de bócio colóide, e foi positiva em todos os carcinomas, pode-se considerar que os resultados contribuem com os estudos que demonstraram a utilidade da associação do marcador ao exame citológico no diagnóstico pré-operatório do CBDT.

Além disso, uma vez empregada no espécime obtido pela PAAF para colaborar com o diagnóstico pré-operatório, a quantificação digital de sua imunoexpressão poderia auxiliar na decisão da extensão da exérese cirúrgica.

Observou-se que o índice de positividade nucleolar, além de alta especificidade e valor preditivo positivo para identificar os casos que apresentaram metástase, permitiu a obtenção da equação para o cálculo do risco individual do acometimento linfático cervical. Os carcinomas com índice de positividade nucleolar acima de 4 nucléolos/CGA apresentaram tendência a um risco individual de desenvolver metástase linfática de 100% (Figura 17). Tal achado sugere a realização do esvaziamento eletivo, pelo menos do compartimento central, nesses casos. Apesar de provavelmente não haver piora da sobrevivência global, a identificação pré-operatória do alto risco de metástase linfática evitaria uma segunda intervenção cirúrgica.

6.6. PERSPECTIVAS

Os resultados da presente pesquisa podem ser usados como base para estudos futuros com a utilização de outros métodos em casuísticas mais abrangentes.

Estudos retrospectivos

A seguir, serão expostos alguns projetos retrospectivos a serem desenvolvidos nessa mesma linha de pesquisa.

Nos mesmos carcinomas analisados, o cálculo da densidade de vasos linfáticos neoformados, pela imunoexpressão de um marcador de linfangiogênese, como o LYVE-1, pode ser utilizado na tentativa de prever o risco individual de metástase linfática. Além disso, a comparação entre o grau de linfangiogênese e o índice de expressão citoplasmática da galectina-3, poderá avaliar sua associação com os casos que exibem invasão linfática.

Outro estudo possível é a comparação da imunoexpressão das metaloproteinases – associadas em estudos anteriores com invasão tecidual local no CBDT – com o índice de expressão citoplasmática da galectina-3.

O AgNor é um marcador que se associa com o fenômeno de transcrição do RNA ribossômico. A quantificação de sua expressão nuclear, comparada ao índice de positividade nucleolar da galectina-3, poderia corroborar com a hipótese da participação da galectina-3 no processo de transcrição do RNA ribossômico no CBDT.

As amostras obtidas pela PAAF, nos casos da presente pesquisa, podem ser coradas pela galectina-3, analisadas de maneira quantitativa e comparadas com os resultados dos respectivos espécimes histológicos. Dessa forma, poderiam validar a aplicação do modelo de predição de metástase na avaliação pré-operatória.

Quanto aos modelos de predição, a comparação da capacidade de predição do modelo de regressão logística com o da rede neural artificial poderá ser realizada com o aumento da casuística.

Estudos prospectivos

Os resultados obtidos fundamentam o desenvolvimento de um protocolo no qual os espécimes obtidos pela PAAF sejam imunocorados com a galectina-3 e os seus índices de expressão analisados de acordo com as características clínicas, anátomo-patológicas e com a evolução dos doentes ao longo do período seguimento. O objetivo final seria a obtenção de uma equação de risco individual para a ocorrência de metástase, conforme ilustrado na presente pesquisa, e a confecção de um gráfico de risco, de fácil emprego na prática clínica. Assim, na consulta pré-operatória, com o laudo do exame imunohistoquímico do material citológico obtido pela PAAF, no qual conste o índice de positividade nucleolar calculado, o cirurgião poderá rapidamente consultar o gráfico do risco de metástase linfática e indicar ou não o esvaziamento cervical para cada doente.

Outra aplicação dos resultados é direcionar estudos de biologia molecular que investiguem as funções da galectina-3 em cada compartimento celular, no CBDT. Um exemplo é o estudo da correlação da expressão nucleoplasmática da galectina-3 com a quantificação do RNAm da ciclina-D1 e c-myc, o que poderia indicar a participação da galectina-3 na via das cateninas, via oncogenética descrita no carcinoma papilífero.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas na presente pesquisa foram:

7.1. Com referência às hipóteses principais

7.1.1. No CBDT, o índice de positividade nucleolar da galectina-3 foi maior no grupo de doentes com metástase;

7.1.2. Foi possível predizer o risco individual da ocorrência de metástase linfática cervical no CBDT em função da quantificação digital da imunoexpressão nucleolar da galectina-3.

7.2. Com referência às hipóteses secundárias

7.2.1. No CBDT, houve imunoexpressão da galectina-3 no citoplasma, nucleoplasma e nucléolo do tireócito maligno. Não houve imunoexpressão do marcador nos tireócitos não neoplásicos;

7.2.2. O índice de expressão citoplasmática da galectina-3 foi maior no CBDT com extensão extratireóidea e invasão linfática;

7.2.3. Não houve diferença da imunoexpressão da galectina-3 quanto à sobrevivência dos doentes acometidos pelo CBDT;

7.2.4. Nos grupos de doentes com e sem metástase, houve indícios de que a galectina-3 pode estar associada com a indução da apoptose pela via extrínseca. Somente no grupo com doença metastática houve indício do envolvimento da galectina-3 com a indução da proliferação celular. Não houve associação da galectina-3 com o grau de angiogênese no CBDT.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO A

Quadro A1 – Classificação AFIP dos subtipos de carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide.

1. CARCINOMA PAPILÍFERO

- a) Típico ou Clássico:
 - apresenta formação em papilas e alterações nucleares, tais como: pseudo-inclusões, fendas nucleares e núcleos vazados (núcleos pálidos ou em vidro fosco).
- b) Micro-carcinoma papilífero (inferior a 10mm)
- c) Variante encapsulada
- d) Variante folicular
- e) Variante folicular encapsulada
- f) Variante sólida ou trabecular
- g) Variante esclerosante difusa
- h) Variante de células altas
- i) Variante de células colunares
- j) Variante de células claras

2. CARCINOMA FOLICULAR

- a) Minimamente invasivo:
 - apresenta invasão microscópica capsular ou vascular
 - a neoplasia folicular de comportamento indeterminado é aquela cuja invasão capsular é duvidosa.
- b) Extensamente invasivo
- c) Tumor oncocítico ou de células de Hürthle

FONTE: Instituto de Patologia das Forças Armadas de Washington¹.

Tabela A1 – Classificação TNM do carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide.

Sigla	Característica
T	Tumor primário
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor menor ou igual a 10 mm no maior diâmetro, limitado à tireóide
T2	Tumor de 10 a 40 mm no maior diâmetro, limitado à tireóide
T3	Tumor maior que 40 mm no maior diâmetro, limitado à tireóide
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão extratireóidea
N	Metástase cervical
Nx	Metástases cervicais não podem ser avaliadas
N0	Sem evidência de metástase cervical
N1	Com metástases cervicais
M	Metástase hematogênica
Mx	Metástase hematogênica não pode ser avaliada
M0	Sem evidência de metástase hematogênica
M1	Com metástase hematogênica

FONTE: UICC, 1999.

Tabela A2 – Estadiamento do carcinoma bem diferenciado da glândula tireóide, com base no TNM.

Estágio	Característica
Estágio 1	Paciente menor de 45 anos, qualquer T e N, M0 Paciente de 45 anos ou mais, T1N0M0
Estágio 2	Paciente menor de 45 anos, qualquer T e N, M1 Paciente de 45 anos ou mais, T2/T3N0M0
Estágio 3	Paciente de 45 anos ou mais, T4N0M0 ou qualquer TN1M0
Estágio 4	Paciente de 45 anos ou mais, qualquer T e NM1

FONTE: UICC, 1999.

Tabela A3 – Índice prognóstico AMES⁸⁴.

Índice prognóstico AMES

Risco relacionado ao doente

Baixo risco: < 45 anos

Alto risco: ≥ 45 anos

Risco relacionado ao carcinoma

Baixo risco:

1) carcinoma ≤ 40 mm de diâmetro (em seu maior eixo)

2) e ausência de extensão extratireóidea

3) e M₀

Alto risco:

1) carcinoma > 40 mm de diâmetro (em seu maior eixo)

2) ou com extensão extratireóidea

3) ou M₁

Legenda:

AMES: A=idade

M=metástase hematogênica

E=extensão extratireóidea

S=tamanho (maior diâmetro do carcinoma)

Tabela A4 – Grupos de risco, determinados segundo o índice prognóstico AMES⁸⁴.

Risco	Baixo risco	Risco intermediário		Alto risco
Relacionado ao doente	< 45 anos	< 45 anos	≥ 45 anos	≥ 45 anos
Relacionado ao carcinoma	Baixo risco	Alto risco	Baixo risco	Alto Risco

8.2. ANEXO B

Tabela A5 – Dados clínicos pré-operatórios dos doentes incluídos no estudo.

n	Gen.	Id.	Etnia	Queixa	Duração (meses)	Ant. pes.	Uso T4 (µg)	Uso anti-tir.	Ex. fis. tireóide	Ex. fis. linf.	T4 pré	TSH pré	TGB pré	Anti TPO	Anti TGB	USG diâm. (mm)	USG eco-gen.	USG micro calcif.	USG linf.	PAAF
1	1	14	1	6	15	0	0	1	4	3	-	-	-	-	0	14	2	0	1	5
2	1	59	1	6	12	0	0	0	2	1	1,00	0,56	-	-	-	-	-	-	-	1
3	1	52	1	1	5	0	0	0	2	0	0,54	-	9,63	-	-	16	1	0	0	2
4	1	37	-	5	6	0	0	0	2	0	0,77	1,68	249,33	0	0	22	2	0	1	2
5	1	35	1	5	6	0	0	0	1	1	-	-	-	-	-	44	1	0	1	6
6	2	61	2	0	-	0	0	0	1	0	0,92	1,87	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1	25	1	6	1	0	0	0	3	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
8	1	45	1	1	36	0	0	0	2	1	1,31	1,59	-	0	0	-	1	1	1	5
9	1	20	1	5	48	1	0	0	2	0	0,85	2,24	-	-	1	-	-	-	-	5
10	1	24	1	6	6	0	0	0	2	0	2,16	0,04	-	0	0	-	-	-	-	1
11	2	34	1	5	9	0	0	0	2	0	1,39	0,05	2039,58	-	-	-	-	-	-	-
12	1	29	1	5	12	0	0	0	2	0	0,92	-	-	-	1	13	1	0	0	1
13	1	35	1	6	36	1	100	0	2	1	0,85	1,12	-	-	1	17	1	0	1	5
14	1	42	1	5	-	0	0	0	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
15	1	34	1	5	5	0	0	0	2	0	1,08	6,53	-	-	0	20	0	0	1	5
16	1	46	1	6	12	4	0	0	2	1	-	-	-	-	0	21	5	0	0	1
17	1	48	1	5	2	0	0	0	2	0	-	-	-	-	1	-	0	0	0	1
18	1	28	1	6	60	1	0	0	2	0	1,08	0,56	48,75	-	0	8	0	0	1	1
19	2	28	1	5	6	0	0	0	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	1	48	1	1	12	0	0	0	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
21	1	46	1	4	-	2	0	0	3	0	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-
22	1	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	1	54	2	5	120	0	0	1	2	1	-	-	-	-	-	30	5	1	0	1
24	1	65	1	5	120	1	0	0	3	0	1,16	2,71	58,33	-	0	38	1	1	0	1
25	1	21	3	6	6	0	0	0	2	1	0,69	0,84	-	-	0	14	1	0	1	1
26	1	75	1	3	1	0	0	0	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	1	62	1	1	-	0	0	0	1	1	1,08	0,07	0,69	-	0	-	-	-	-	-
28	1	50	1	5	4	4	0	0	2	0	1,16	-	-	-	0	27	1	2	1	1
29	1	34	1	6	7	1	0	0	3	0	2,60	-	-	0	0	-	-	-	-	1
30	2	11	1	5	12	4	0	0	1	1	0,69	-	-	-	0	-	0	0	1	5
31	1	56	1	6	24	4	0	0	3	0	7,60	1,10	-	-	0	-	-	-	-	2
32	1	74	1	2	2	4	0	0	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
33	1	25	1	6	12	0	0	0	2	0	0,92	1,77	-	-	-	40	3	0	0	3
34	1	72	1	5	-	4	0	0	2	0	1,16	4,76	-	0	0	-	-	-	-	1
35	1	35	1	6	24	0	0	0	2	0	1,39	0,05	-	-	0	-	-	-	-	1
36	1	28	-	0	-	0	0	0	1	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
37	1	56	2	7	-	4	0	0	2	0	1,31	1,59	65,27	-	0	-	1	0	0	1
38	1	33	1	6	12	0	0	0	3	0	-	4,10	-	-	0	-	-	-	-	1
39	1	25	2	5	48	1	0	0	2	0	-	-	-	-	-	35	5	0	0	1
40	1	51	-	6	-	0	0	0	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	2	50	1	5	12	0	0	0	2	0	1,39	0,09	738,33	0	0	10	5	2	0	1
42	1	69	1	0	-	0	0	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	1	61	-	5	3	0	0	1	2	0	0,54	15,21	1,25	-	0	-	-	-	-	5
44	1	65	1	5	-	4	0	0	2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1
45	1	15	1	5	5	0	0	0	2	0	0,77	1,03	132,91	0	0	35	3	0	0	2
46	1	41	2	5	10	0	0	0	2	0	1,14	0,53	101,27	-	-	30	1	2	0	2
47	1	36	1	6	6	0	0	0	2	0	1,01	1,00	-	-	1	-	-	-	-	2
48	1	69	1	1	6	4	0	0	2	1	1,05	1,16	-	-	0	10	3	0	0	5
49	2	68	-	6	48	4	0	0	2	0	-	-	-	-	1	37	1	2	0	1
50	1	40	-	6	144	0	0	0	3	0	-	-	-	0	0	19	5	0	0	3

LEGENDA:

Gen. = gênero: 1=feminino, 2=masculino;

Id. = idade;

Etnia: 1=branco, 2=pardo, 3=negro, 4=amarelo;

Queixa: 1=disfagia/odinofagia, 2=disfonia, 3=dispnéia, 4=aumento da tireóide, 5=nódulo cervical, 6=aumento do volume cervical, 7=outras;

Ant. pes. (Antecedentes Pessoais): 1=tabagismo, 2=etilismo, 3=irradiação ionizante, 4=outras;

Uso anti-tir. (uso de anti tireóideo): 0=não, 1=sim;

Ex. fis. tireóide (exame físico da tireóide):

1=sem bócio, 2=bócio uninodular;

3=bócio multinodular; 4=bócio difuso;

Ex. fis. linf. (exame físico dos linfonodos):

1=mesmo lado do carcinoma;

2=contra lateral ao carcinoma; 3=bilateral;

USG diâm. = diâmetro do nódulo ao exame ultrassonográfico;

USG ecogen. (ecogenicidade do nódulo ao exame ultrassonográfico):

1=hipoecogênico, 2=hiperecogênico, 3=isoecogênico, 4=anecóico, 5=misto;

USG microcalcif. (microcalcificações ao exame ultrassonográfico): 0=ausente, 1=presente, 2=presença de calcificações grosseiras;

USG linf. (características ultrassonográficas dos linfonodos cervicais): 0=linfonodos normais;

1=linfonodos aumentados;

PAAF = punção aspirativa por agulha fina.

(continua)

(continuação)

n	Gen.	Id.	Etnia	Queixa	Duração (meses)	Ant. pes.	Uso T4	Uso anti-tir.	Ex. fis. tireóide	Ex. fis. linf.	T4 pré	TSH pré	TGB pré	Anti TPO	Anti TGB	USG diâm. (mm)	USG ecogen.	USG microcalcif.	USG linf.	PAAF
51	1	48	-	4	12	1	0	0	2	0	0,77	0,28	-	1	0	18	5	1	0	2
52	1	30	1	5	360	0	0	0	2	0	0,92	2,80	652,67	-	0	38	1	0	0	2
53	1	77	1	2	2	0	0	0	2	0	-	-	-	0	0	-	-	-	-	1
54	1	22	1	6	1	1	0	0	2	0	1,62	0,42	-	0	0	10	1	0	1	5
55	1	27	1	5	1	0	0	0	2	0	0,97	1,16	34,00	-	-	20	1	2	0	1
56	1	43	2	5	-	0	0	0	2	0	0,73	7,98	-	-	-	16	1	1	0	-
57	1	48	2	5	60	1	0	0	2	0	1,00	1,03	-	-	0	8	4	0	0	2
58	2	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	1	37	1	1	6	4	0	0	4	0	0,73	1,58	-	-	0	-	-	-	-	-
60	1	45	4	2	4	0	0	0	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	2	43	1	6	48	1	0	0	2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1
62	1	41	1	1	12	0	0	0	2	0	0,89	3,57	-	0	0	10	5	0	0	1
63	1	21	1	6	18	0	0	0	2	1	1,00	2,30	-	1	0	30	1	0	1	1
64	1	40	-	5	4	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-	24	2	0	0	2
65	1	45	1	0	-	4	0	0	2	0	-	-	-	0	0	6	1	0	0	1
66	1	42	2	7	4	4	0	0	2	0	1,00	1,90	-	-	0	28	5	0	0	1
67	2	77	1	5	228	4	0	1	2	2	0,57	1,37	-	-	1	-	2	0	0	2
68	1	49	2	5	36	0	0	0	2	0	0,82	2,10	-	-	0	-	-	-	-	-
69	1	44	1	6	6	0	0	0	2	0	1,30	0,02	-	-	0	23	1	0	0	-
70	1	17	-	5	480	0	0	1	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
71	1	37	2	5	6	1	0	0	2	3	-	-	-	-	0	-	-	-	-	1
72	1	31	1	5	24	0	0	0	3	0	1,05	1,89	-	0	0	19	5	1	1	3
73	1	51	2	4	24	1	0	0	2	0	1,05	0,63	-	-	0	36	1	2	0	3
74	1	38	1	5	84	4	0	0	2	0	-	2,70	-	-	1	-	-	-	-	3
75	1	38	1	4	12	4	100	1	4	0	2,02	0,00	-	0	0	25	5	2	0	-
76	2	65	1	5	12	4	200	0	1	1	1,89	2,92	890,91	-	-	-	-	-	-	-
77	1	43	-	5	6	1	0	1	2	2	0,98	0,11	-	0	0	45	1	0	0	-
78	1	48	1	5	12	4	0	0	2	0	1,00	2,60	82,91	0	0	19	5	0	0	1
79	2	16	1	6	3	0	0	0	2	0	1,20	1,10	-	-	-	-	-	-	-	2
80	1	62	1	5	420	4	0	0	3	1	0,16	105,00	-	-	0	-	-	-	-	2
81	1	60	1	6	8	4	0	0	2	0	0,81	1,79	-	-	0	14	1	0	0	1
82	1	48	1	5	2	4	0	0	2	0	1,06	0,95	-	-	0	21	1	0	1	1
83	1	19	1	6	2	0	0	0	4	3	-	-	890,91	-	-	6	1	1	1	1
84	1	68	1	6	24	0	0	0	2	0	0,85	2,52	687,50	0	0	-	-	-	-	2
85	1	49	-	0	-	0	0	0	2	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
86	1	55	1	5	72	4	0	0	2	0	0,92	0,75	-	-	0	10	1	1	0	1
87	1	37	1	0	-	4	0	0	1	0	1,31	0,09	58,33	0	0	8	1	0	0	1
88	1	27	1	5	-	0	0	0	2	0	-	-	-	-	0	32	1	1	1	2
89	1	55	2	1	480	4	0	0	2	0	1,05	1,37	-	-	0	12	1	0	0	1
90	1	44	2	1	-	0	0	0	1	0	1,62	0,03	-	-	0	-	-	-	-	-
91	2	42	1	1	48	0	0	0	2	0	-	-	-	-	0	44	5	1	0	1
92	1	48	2	6	72	4	0	0	3	0	0,92	0,37	767,27	0	0	40	3	0	0	-
93	1	41	1	5	24	0	0	0	2	0	0,80	1,78	8,18	0	0	19	1	0	0	2
94	1	22	1	5	12	0	0	0	3	0	-	-	-	0	0	25	1	0	1	1
95	1	44	2	6	6	0	0	0	2	0	1,30	0,21	-	-	0	60	5	0	1	3
96	1	54	-	0	-	0	0	0	1	0	0,77	3,80	6,23	0	0	-	-	-	-	-
97	1	51	1	3	180	0	0	0	2	0	0,89	1,89	-	1	0	17	1	1	0	2
98	1	58	1	4	24	1	0	0	2	0	1,10	1,47	6,55	0	0	13	1	0	0	1
99	1	51	1	5	48	4	0	0	2	0	1,13	2,10	-	-	0	-	-	-	-	1
100	2	28	2	1	120	4	0	0	2	0	0,69	0,93	-	0	0	56	5	2	0	2
101	1	50	1	5	48	4	0	0	2	0	1,30	0,74	-	-	0	40	1	2	0	1
102	1	78	1	1	-	4	0	0	3	0	0,90	2,55	-	0	1	6	5	0	0	2
103	1	32	1	5	120	0	0	0	2	0	0,54	1,21	2083,33	0	-	125	1	0	0	2
104	1	57	-	5	96	0	0	0	2	1	0,49	0,53	-	-	1	-	-	-	-	-
105	1	39	-	0	-	0	0	0	2	1	1,13	0,05	-	0	0	-	-	-	-	-
106	1	63	1	5	192	0	0	0	2	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
107	2	39	1	6	6	1	0	0	2	0	0,69	1,59	-	-	0	10	1	1	1	5
108	2	55	2	5	7	4	0	0	2	0	-	-	-	0	0	33	1	2	0	1
109	1	32	1	5	72	0	0	0	3	0	-	-	-	0	1	-	1	0	0	1

LEGENDA:

Gen. = gênero: 1=feminino, 2=masculino;**Id.** = idade;**Etnia:** 1=branco, 2=pardo, 3=negro, 4=amarelo;**Queixa:** 1=disfagia/odinofagia, 2=disfonia, 3=dispnéia, 4=aumento da tireóide, 5=nódulo cervical, 6=aumento do volume cervical, 7=outras;**Ant. pes.** (Antecedentes Pessoais): 1=tabagismo, 2=etilismo, 3=irradiação ionizante, 4=outros;**Uso anti-tir.** (uso de anti tireóideo): 0=não, 1=sim;**Ex. fis. tireóide** (exame físico da tireóide):

1=sem bócio, 2=bócio uninodular; 3=bócio multinodular; 4=bócio difuso;

Ex. fis. linf. (exame físico dos linfonodos):

1=mesmo lado do carcinoma;

2=contra lateral ao carcinoma; 3=bilateral;

USG diâm. = diâmetro do nódulo ao exame ultrassonográfico;**USG ecogen.** (ecogenicidade do nódulo ao exame ultrassonográfico):

1=hipoecogênico, 2=hiperecogênico, 3=isoecogênico, 4=anecóico, 5=misto;

USG microcalcif. (microcalcificações ao exame ultrassonográfico): 0=ausente, 1=presente, 2=presença de calcificações grosseiras;**USG linf.** (características ultrassonográficas dos linfonodos cervicais): 0=linfonodos normais; 1=linfonodos aumentados;**PAAF** = punção aspirativa por agulha fina.

Tabela A6 – Dados do tratamento cirúrgico, clínicos pós-operatórios e seguimento dos doentes incluídos no estudo.

n	Tipo op.	Totaliz.	Esvaz.	PCI local	PCI captação (% / 24h)	RIT	RIT dose (mCi)	Tempo TT/RIT (ms)	QT RT pós	Dose T4 pós (µg)	TSH pós	TGB pós	Seguim. (meses)	Status	Sobrev. livre doença (meses)	Status doença	Local recidiva
1	3	0	3	1	1,0	1	600	2	0	250	1	1	134	1	57	1	4
2	4	0	2	2	-	1	300	-	0	-	-	1	56	2	51	1	2
3	3	0	0	1	1,0	1	-	-	0	-	-	0	61	1	61	0	0
4	3	0	2	1	1,0	1	-	8	0	150	0	0	92	1	92	0	0
5	3	0	2	1	1,0	1	-	-	0	-	-	0	63	1	63	0	0
6	3	0	0	1	-	1	-	-	0	-	-	1	2	2	0	1	0
7	3	0	2	1	1,0	1	150	7	0	200	1	0	139	1	26	1	2
8	3	0	2	2	4,7	1	250	37	0	100	1	0	110	1	20	1	4
9	3	0	2	1	1,0	1	-	-	0	100	1	1	60	1	60	0	0
10	3	0	2	1	1,0	1	-	42	0	150	0	0	169	1	40	1	2
11	3	0	2	2	1,0	1	900	85	3	300	0	1	190	1	86	1	4
12	3	0	2	1	1,0	1	150	73	0	100	1	0	105	1	60	1	2
13	3	0	2	1	2,2	1	-	-	0	200	1	1	61	1	11	1	2
14	2	0	0	0	-	1	-	-	0	-	1	0	110	1	110	0	0
15	3	0	2	1	0,5	1	-	-	0	200	0	0	101	1	101	0	0
16	3	1	3	1	1,0	1	-	-	0	250	1	0	72	1	72	0	0
17	3	0	0	2	1,0	1	-	9	0	125	0	0	101	1	101	0	0
18	3	0	2	1	0,5	1	-	-	0	275	0	0	88	1	88	0	0
19	3	0	1	0	-	1	-	-	0	-	-	0	104	1	104	0	0
20	3	0	2	1	1,0	1	100	12	0	250	1	0	64	1	64	0	0
21	3	0	1	0	-	1	-	11	0	150	0	0	110	1	110	0	0
22	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-
23	3	0	2	1	3,0	1	-	3	0	200	0	0	98	1	10	1	2
24	3	0	1	1	0,1	1	100	25	0	50	0	0	96	1	96	0	0
25	3	0	2	1	3,0	1	150	5	0	150	0	0	91	1	91	0	0
26	3	1	0	0	-	1	-	-	0	-	-	0	11	2	10	1	3
27	3	0	1	0	-	1	-	1	0	100	0	0	156	2	35	1	5
28	3	0	0	1	0,6	1	300	2	0	150	1	1	86	1	47	1	5
29	3	0	0	1	2,0	1	-	10	0	200	0	0	92	1	92	0	0
30	3	0	2	1	1,4	1	-	4	0	250	1	0	92	1	68	1	1
31	3	1	0	1	6,0	1	100	14	0	250	1	0	89	1	89	0	0
32	4	1	0	1	7,0	0	-	-	0	-	-	0	1	2	0	1	0
33	3	1	0	1	2,5	1	-	8	0	100	1	0	93	1	93	0	0
34	3	0	0	1	2,0	1	100	14	0	100	0	0	94	1	94	0	0
35	3	0	2	2	1,5	1	250	21	0	100	0	0	87	1	10	1	2
36	3	0	0	1	-	0	-	-	0	-	0	0	85	1	85	0	0
37	3	0	0	1	2,0	0	-	-	0	125	0	0	84	1	84	0	0
38	3	0	0	1	2,0	1	150	13	0	150	1	0	84	1	84	0	0
39	3	0	0	1	2,0	0	-	-	0	200	1	0	14	1	14	0	0
40	3	0	0	0	-	1	-	-	0	100	-	0	83	1	83	0	0
41	3	1	0	1	1,0	1	100	40	0	150	1	0	72	1	72	0	0
42	3	0	2	0	-	1	-	51	0	175	-	1	89	1	51	1	3
43	3	0	2	1	1,0	1	-	-	0	150	0	0	85	1	85	0	0
44	3	0	0	1	-	0	-	-	0	-	0	0	62	3	62	0	0
45	3	1	0	1	-	0	-	-	0	125	1	0	87	1	87	0	0
46	3	0	0	0	-	1	200	1	0	200	1	0	15	1	15	0	0
47	3	0	0	1	1,5	0	-	-	0	200	-	0	14	1	14	0	0
48	3	0	2	1	1,5	1	150	15	0	125	1	1	84	1	84	0	0
49	3	0	0	1	1,0	0	-	-	0	137	1	0	81	1	81	0	0
50	3	0	2	1	-	1	230	3	0	200	1	0	80	1	6	1	2

LEGENDA:

Tipo op. (tipo de operação):

1=menor que lobectomia, 2=lobectomia,
3=tireoidectomia total,
4=maior que tireoidectomia total;

Totaliz. (totalização): 0=não realizada,

1=realizada;

Esvaz. (tipo de esvaziamento cervical):

1=compartimento central;
2=homolateral; 3=bilateral;

PCI local (local da captação):

0=não realizada,
1=hipercaptante no leito tireóideo,
2=hipercaptação cervical lateral;
3=outras áreas.

RIT (radioiodoterapia):

0=não realizada, 1=realizada;

Tempo TT/RIT= tempo entre a tireoidectomia e a radioiodoterapia;

QT/RT pós (no pós-operatório): 0=não; 1=sim;**Dose T4 pós** = dose de T4 administrada no pós-operatório;**TSH pós** (no pós-operatório): 0=normal; 1=elevado;**TGB pós** (no pós-operatório):

0=curva estável; 1=curva ascendente;

Seguim. = seguimento em meses;**Status:** 1=vivo, 2=morte correlacionada,

3=morte não correlacionada, vazio=perdido;

Status doença: 0=sem recidiva, 1=com recidiva;

Local recidiva: 0=sem recidiva, 1=leito tireóideo,
2=cervical lateral, 3=hematogênica,
4=2 e 3, 5=1 e 3.

(continua)

(continuação)

n	Tipo op.	Totaliz.	Esvaz.	PCI local	PCI captação (% / 24h)	RIT	RIT dose (mCi)	Tempo TT/RIT (ms)	QT RT pós	Dose T4 pós (µg)	TSH pós	TGB pós	Seguim. (meses)	Status	Sobrev. livre doença (meses)	Status doença	Local recidiva
51	3	0	0	1	2,0	0	-	-	0	250	1	0	63	1	63	0	0
52	3	1	0	1	4,0	0	-	-	0	200	0	0	82	1	82	0	0
53	4	0	2	1	1,0	1	250	37	0	-	1	1	52	3	19	1	4
54	3	0	3	1	1,0	1	160	101	0	200	0	0	153	1	58	1	2
55	3	0	0	1	-	1	-	6	0	175	-	0	83	1	83	0	0
56	3	1	2	1	5,0	1	-	-	0	150	0	0	66	1	66	0	0
57	3	1	0	1	5,5	0	-	-	0	150	0	0	74	1	74	0	0
58	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-
59	3	1	0	1	4,8	0	-	-	0	250	1	0	77	1	77	0	0
60	3	0	0	1	-	0	-	-	0	75	-	0	80	1	80	0	0
61	3	0	0	1	1,0	1	-	15	0	-	1	0	74	1	74	0	0
62	3	0	1	3	1,2	1	200	26	0	100	1	0	76	1	76	0	0
63	3	0	0	1	0,5	1	100	19	0	200	0	0	77	1	77	0	0
64	3	0	0	1	-	0	-	-	0	-	-	0	62	1	62	0	0
65	3	0	1	1	1,4	1	100	6	0	100	0	0	72	1	72	0	0
66	3	0	0	1	1,0	1	-	11	0	150	1	0	71	1	71	0	0
67	3	0	2	1	1,0	1	100	11	0	175	0	0	35	3	28	1	2
68	3	0	0	1	-	1	360	24	0	150	0	0	76	1	76	0	0
69	3	1	0	3	3,5	1	100	14	0	100	1	0	71	1	71	0	0
70	3	0	0	1	1,0	0	-	-	0	150	1	0	69	1	69	0	0
71	3	0	3	1	2,0	1	150	17	0	200	1	0	67	1	67	0	0
72	3	0	3	1	2,5	1	150	12	0	175	0	0	71	1	71	0	0
73	3	0	0	1	3,0	0	-	-	0	150	0	0	71	1	71	0	0
74	3	0	1	1	-	0	-	-	0	175	1	0	72	1	72	0	0
75	3	0	0	1	2,0	0	-	-	0	200	0	0	69	1	69	0	0
76	3	0	2	0	-	1	-	1	0	-	-	1	63	1	20	1	2
77	3	0	0	1	1,0	0	-	-	0	150	1	0	69	1	69	0	0
78	3	0	0	1	2,0	1	-	7	0	-	0	0	73	1	73	0	0
79	3	1	0	1	0,5	0	-	-	0	200	0	0	14	1	14	0	0
80	4	0	0	1	3,5	1	118	26	0	150	0	1	40	1	15	1	1
81	3	0	0	1	2,0	1	-	15	0	150	0	1	64	1	64	0	0
82	3	0	3	2	3,0	1	250	5	0	125	0	0	68	1	68	0	0
83	3	0	3	2	7,5	1	200	17	0	125	1	0	60	1	60	0	0
84	3	1	0	0	-	1	-	11	0	-	1	0	72	1	72	0	0
85	2	0	0	0	-	0	-	-	0	-	1	0	62	1	62	0	0
86	3	0	0	1	2,0	0	-	-	0	100	0	0	66	1	66	0	0
87	3	0	0	1	2,0	1	150	33	0	-	0	0	72	1	72	0	0
88	3	0	3	2	0,5	1	250	11	0	200	0	1	68	1	68	0	0
89	3	0	0	1	2,0	0	-	-	0	70	0	0	65	1	65	0	0
90	3	0	0	1	-	1	-	2	0	112	0	0	71	1	71	0	0
91	4	0	0	1	-	1	150	7	0	150	0	0	67	1	67	0	0
92	3	0	0	1	-	0	-	-	0	100	0	0	63	1	63	0	0
93	3	1	0	1	1,0	1	-	17	0	125	0	0	67	1	67	0	0
94	3	0	0	1	0,8	0	-	-	0	100	1	0	66	1	66	0	0
95	3	1	0	1	3,0	1	150	10	0	150	0	0	64	1	64	0	0
96	3	0	0	1	0,4	1	100	12	0	150	1	0	62	1	62	0	0
97	3	0	0	1	2,5	0	-	-	0	150	0	0	65	1	65	0	0
98	3	0	0	1	0,6	0	-	-	0	100	0	0	62	1	62	0	0
99	3	0	1	1	1,5	1	-	11	0	225	1	0	63	1	63	0	0
100	3	1	0	1	-	0	-	-	0	125	0	0	62	1	62	0	0
101	3	0	0	3	1,0	1	120	25	0	100	1	0	60	1	60	0	0
102	3	1	0	1	3,0	1	147	23	0	125	0	0	61	1	61	0	0
103	2	0	0	0	-	1	150	4	0	150	1	1	13	1	13	0	0
104	3	0	1	3	-	1	-	-	0	-	0	1	11	2	0	1	0
105	3	0	0	1	-	0	-	-	0	-	1	0	61	1	61	0	0
106	3	0	1	0	-	1	175	33	0	200	0	0	66	1	66	0	0
107	3	0	2	1	2,5	1	172	32	0	175	1	0	60	1	60	0	0
108	4	0	1	1	2,0	1	490	7	0	150	1	1	106	1	57	1	4
109	3	0	0	1	-	1	232	23	0	100	1	1	71	1	71	0	0

LEGENDA:

Tipo op. (tipo de operação):

- 1=menor que lobectomia, 2=lobectomia,
3=tireoidectomia total,
4=maior que tireoidectomia total;

Totaliz. (totalização): 0=não realizada, 1=realizada;**Esvaz.** (tipo de esvaziamento cervical):

- 1=compartimento central;
2=homolateral; 3=bilateral;

PCI local (local da captação):

- 0=não realizada,
1=hipercaptante no leito tireóideo,
2=hipercaptção cervical lateral;
3=outras regiões.

RIT (radioiodoterapia):

- 0=não realizada, 1=realizada;

Tempo TT/RIT= tempo entre a tireoidectomia e a radioiodoterapia;**QT/RT pós** (no pós-operatório): 0=não; 1=sim;**Dose T4 pós** = dose de T4 administrada no pós-operatório;**TSH pós** (no pós-operatório): 0=normal; 1=elevado;**TGB pós** (no pós-operatório): 0=curva estável; 1=curva ascendente;**Seguim.** = seguimento em meses;**Status.** 1=vivo, 2=morte correlacionada, 3=morte não correlacionada, vazio=perdido;**Status doença:** 0=sem recidiva, 1=com recidiva;**Local recidiva:** 0=sem recidiva, 1=leito tireóideo, 2=cervical lateral, 3=hematogênica, 4=2 e 3, 5=1 e 3.

Tabela A7 – Características anátomo-patológicas dos carcinomas, estadiamento TNM e classificação AMES dos doentes incluídos no estudo.

n	Tipo hist.	Papilíf. subtipos	Micro inv.	Bócio	Tireoi-dite	Multi centr.	Ext. extra tir.	Inv. vasc.	Inv. linfát.	Inv. perin.	Diâm. ca. (mm)	N op.	N final	M op.	M final	Est. TNM op.	Local meta hem.	Risco do doente	Risco do carcinoma	Classific. AMES op.
1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	8	1	1	0	1	1	3	1	1	1
2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	50	1	1	0	0	3	0	2	2	3
3	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	26	1	1	0	0	3	0	2	2	3
4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	22	1	1	0	0	1	0	1	1	1
5	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	10	1	1	0	0	1	0	1	2	2
6	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	20	1	1	1	1	4	4	2	2	3
7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	1	0	0	1	0	1	1	1
8	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	42	1	1	0	1	3	1	2	2	3
9	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	22	1	1	0	0	1	0	1	2	2
10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28	1	1	0	0	1	0	1	1	1
11	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	1	0	1	1	8	1	1	1
12	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	15	1	1	0	0	1	0	1	1	1
13	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	22	1	1	0	0	1	0	1	2	2
14	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	45	1	1	0	0	1	0	1	2	2
15	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	20	1	1	0	0	1	0	1	1	1
16	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3	0	2	1	2
17	1	3	0	0	0	1	1	0	0	0	22	1	1	0	0	3	0	2	2	3
18	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	12	1	1	0	0	1	0	1	1	1
19	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	42	1	1	0	0	1	0	1	2	2
20	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	18	1	1	0	0	3	0	2	2	3
21	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	22	1	1	0	0	3	0	2	2	3
22	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	40	1	1	0	0	1	0	1	2	2
23	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	38	1	1	0	0	3	0	2	2	3
24	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	44	1	1	0	0	3	0	2	2	3
25	1	3	0	1	0	1	0	0	0	0	17	1	1	0	0	1	0	1	1	1
26	2	-	0	1	0	0	0	1	0	0	75	0	0	0	1	2	2	2	2	3
27	1	2	0	0	0	0	1	0	1	0	15	1	1	0	1	3	3	2	2	3
28	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	30	1	1	0	1	3	3	2	2	3
29	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	30	0	0	0	0	1	0	1	2	2
30	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	7	1	1	0	0	1	0	1	1	1
31	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	2	0	2	1	2
32	1	2	0	0	0	1	1	0	1	1	45	0	0	0	0	3	0	2	2	3
33	2	-	1	0	0	0	0	1	0	0	35	0	0	0	0	1	0	1	1	1
34	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	2	0	2	1	2
35	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	40	0	1	0	0	1	0	1	2	2
36	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	13	0	0	0	0	1	0	1	2	2
37	1	3	0	0	0	1	0	0	1	1	12	0	0	0	0	2	0	2	1	2
38	1	3	0	0	0	1	1	1	1	1	45	1	1	0	0	1	0	1	2	2
39	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	70	0	0	0	0	1	0	1	2	2
40	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	32	0	0	0	0	2	0	2	1	2
41	2	-	1	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	2	0	2	2	3
42	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	3	1	1	0	1	3	2	2	1	2
43	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3	1	1	0	0	3	0	2	1	2
44	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	12	0	0	0	0	3	0	2	2	3
45	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	1	0	1	1	1
46	1	3	0	0	0	1	1	1	1	1	30	0	0	0	0	1	0	1	2	2
47	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	50	0	0	0	0	1	0	1	2	2
48	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	35	1	1	0	0	3	0	2	2	3
49	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	30	0	0	0	0	2	0	2	1	2
50	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	30	0	1	0	0	1	0	1	1	1

LEGENDA:

Tipo hist (tipo histológico):

1=carcinoma papilífero, 2=carcinoma folicular;

Papilíf. subtipos (subtipos do carcinoma papilífero):

1=clássico, 2=de células altas 3=folicular, 4=outros;

Micro inv. (micro-invasão): 0=ausente,

1=carcinoma minimamente invasivo;

Bócio: 0=não, 1=sim;

Tireoidite: 0=não, 1=sim;

Multicentr. (multicentricidade): 0=não, 1=sim;

Ext. extratir. (extensão extratireóidea): 0=não, 1=sim;

Inv vasc. (invasão vascular): 0=não, 1=sim;

Inv. linfát. (invasão linfática): 0=não, 1=sim;

Inv. perin. (invasão perineural): 0=não, 1=sim;

Diâm. ca. (mm) = diâmetro do carcinoma em milímetros;

N op. (metástase linfática perioperatória): 0=não, 1=sim;

N final (ao final do seguimento): 0=não, 1=sim;

M op. (metástase hematogênica): 0=não, 1=sim;

M final (ao final do seguimento): 0=não, 1=sim;

Est. TNM op. (estadiamento TNM perioperatório):

1=estágio 1, 2=estágio 2,

3=estágio 3, 4=estágio 4;

Local meta. hem. (local metástase hematogênica):

0=sem metástase, 1=pulmonar, 2=óssea,

3=mediastinal, 4=cerebral, 5=pele e subcutâneo,

6=1 e 2, 7=1 e 3, 8=1 e 2 e 3, 9=outras;

Risco do doente: 1 < 45 anos, 2 ≥ 45 anos;

Risco do carcinoma: 1=baixo, 2= alto;

Classific. AMES op. (classificação AMES):

1=baixo risco, 2=risco intermediário, 3=alto risco.

(continua)

(continuação)

n	Tipo hist.	Papilif. subtipos	Micro inv.	Bócio	Tireoidite	Multi centr.	Ext. extra tir.	Inv. vasc.	Inv. linfát.	Inv. perin.	Diâm. ca. (mm)	N op.	N final	M op.	M final	Est. TNM op.	Local meta hem.	Risco do doente	Risco do carcinoma	Classific. AMES op.
51	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	1	0	2	1	2
52	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	1	1	1
53	1	2	0	1	0	0	1	1	0	0	30	0	1	0	1	3	1	2	2	3
54	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	31	1	1	0	0	1	0	1	2	2
55	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	15	1	1	0	0	1	0	1	1	1
56	1	4	0	0	1	1	1	0	1	0	14	1	1	0	0	1	0	1	2	2
57	2	-	1	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	1	0	2	1	2
58	2	-	1	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	1	0	1	2	2
59	2	-	1	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	0	0	1	0	1	2	2
60	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	1	0	2	1	2
61	1	2	0	1	0	1	1	0	0	0	27	0	0	0	0	1	0	1	2	2
62	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	15	1	1	1	1	2	3	1	2	2
63	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0	20	1	1	0	0	1	0	1	2	2
64	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	0	1	1	1
65	1	2	0	1	1	1	1	0	0	0	7	0	0	0	0	3	0	2	2	3
66	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	45	0	0	0	0	1	0	1	2	2
67	2	-	0	0	0	0	1	1	1	0	120	0	1	0	0	3	0	2	2	3
68	1	3	0	1	0	1	1	1	0	0	27	0	0	0	0	3	0	2	2	3
69	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0	0	1	1	2	1	1	2	2
70	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	1	0	1	1	1
71	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	12	1	1	0	0	1	0	1	1	1
72	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	10	1	1	0	0	1	0	1	2	2
73	1	3	0	1	1	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0	2	0	2	1	2
74	1	3	0	0	1	1	0	0	0	0	17	0	0	0	0	1	0	1	1	1
75	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	7	0	0	0	0	1	0	1	2	2
76	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	1	0	0	2	0	2	1	2
77	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	17	0	0	0	0	1	0	1	1	1
78	1	3	0	0	1	1	0	0	0	0	15	0	0	0	0	2	0	2	1	2
79	1	3	0	0	1	0	0	1	0	0	30	0	0	0	0	1	0	1	1	1
80	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	110	0	0	0	0	3	0	2	2	3
81	1	3	0	1	0	0	0	1	0	0	55	0	0	0	0	2	0	2	2	3
82	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	15	1	1	0	0	3	0	2	2	3
83	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	50	1	1	0	0	1	0	1	2	2
84	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	2	0	2	1	2
85	2	-	1	0	1	0	0	1	0	0	32	0	0	0	0	2	0	2	1	2
86	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	1	0	2	1	2
87	1	2	0	0	1	1	1	0	0	0	10	0	0	0	0	1	0	1	2	2
88	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	31	1	1	0	0	1	0	1	2	2
89	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	1	0	2	1	2
90	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	1	0	1	1	1
91	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	10	1	1	0	0	1	0	1	2	2
92	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	1	0	2	1	2
93	2	-	1	0	0	0	0	1	0	0	12	0	0	0	0	1	0	1	1	1
94	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	1	0	1	1	1
95	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	0	1	1	1
96	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	10	0	0	0	0	1	0	2	1	2
97	1	3	0	0	1	0	0	1	0	0	40	0	0	0	0	2	0	2	2	3
98	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	1	0	2	1	2
99	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	17	1	1	0	0	3	0	2	1	2
100	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	0	1	0	1	2	2
101	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0	35	0	0	1	1	4	1	2	2	3
102	2	-	1	0	1	0	0	1	0	0	10	0	0	0	0	1	0	2	1	2
103	2	-	0	1	0	0	0	1	0	0	90	0	0	0	0	1	0	1	2	2
104	1	3	0	0	0	1	0	1	1	0	100	1	1	1	1	4	1	2	2	3
105	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	11	0	0	0	0	1	0	1	2	2
106	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	18	1	1	0	0	3	0	2	2	3
107	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	5	1	1	0	0	1	0	1	2	2
108	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	43	1	1	0	1	3	1	2	2	3
109	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	25	1	1	0	0	1	0	1	1	1

LEGENDA:

Tipo hist (tipo histológico):

1=carcinoma papilífero, 2=carcinoma folicular;

Papilif. subtipos (subtipos do carcinoma papilífero):

1=clássico, 2=de células altas 3=folicular, 4=outros;

Micro inv. (micro-invasão): 0=ausente,

1=carcinoma minimamente invasivo;

Bócio: 0=não, 1=sim;**Tireoidite**: 0=não, 1=sim;**Multicentr.** (multicentricidade): 0=não, 1=sim;**Ext. extratir.** (extensão extratireóidea): 0=não, 1=sim;**Inv. vasc.** (invasão vascular): 0=não, 1=sim;**Inv. linfát.** (invasão linfática): 0=não, 1=sim;**Inv. perin.** (invasão perineural): 0=não, 1=sim;**Diâm. ca.** (mm) = diâmetro do carcinoma em milímetros;**N op.** (metástase linfática perioperatória): 0=não, 1=sim;**N final** (ao final do seguimento): 0=não, 1=sim;**M op.** (metástase hematogênica): 0=não, 1=sim;**M final** (ao final do seguimento): 0=não, 1=sim;**Est. TNM op.** (estadiamento TNM perioperatório):

1=estágio 1, 2=estágio 2,

3=estágio 3, 4=estágio 4;

Local meta. hem. (local metástase hematogênica):

0=sem metástase, 1=pulmonar, 2=óssea,

3=mediastinal, 4=cerebral, 5=pele e subcutâneo,

6=1 e 2, 7=1 e 3, 8=1 e 2 e 3, 9=outras;

Risco do doente: 1 < 45 anos, 2 ≥ 45 anos;**Risco do carcinoma**: 1=baixo, 2= alto;**Classific. AMES op.** (classificação AMES):

1=baixo risco, 2=risco intermediário, 3=alto risco.

8.3. ANEXO C

Tabela A8 – Valores obtidos pela quantificação imunohistoquímica dos marcadores estudados em cada caso.

n	Galectina IP nucléolo n/CGA	Galectina IP núcleo (%)	Galectina citoplasm. IP (%)	Galectina citoplasm. ItE (uo/ μ m ²)	Galectina citoplasm. IE (uo/ μ m ²)	Galec. tecido normal	Galec. bócio	Galec. tireoi dite	Ki-67 n/CGA	Caspase IP (%)	Caspase ItE (uo/ μ m ²)	Caspase IE (uo/ μ m ²)	Caspase tecido normal	CD-34 n/mm ²
1	0,00	21,20	70,00	56,83	39,78	-	-	-	1,64	1,00	59,99	0,60	-	693,88
2	0,00	22,91	79,46	87,59	69,60	-	-	-	8,00	90,45	47,57	43,03	-	342,86
3	1,89	15,80	74,14	73,48	54,48	-	-	0	0,00	85,89	72,95	62,65	-	530,61
4	10,88	18,87	91,12	78,39	71,43	0	-	-	3,25	89,40	83,05	74,24	1	438,78
5	0,00	0,27	18,17	56,96	10,35	-	0	-	1,00	6,10	81,39	4,96	1	540,82
6	0,00	5,99	24,85	66,49	16,52	0	-	-	0,20	4,50	58,73	2,64	1	897,96
7	0,55	2,02	4,51	65,61	2,96	-	-	-	0,00	4,60	95,73	4,40	-	440,82
8	0,00	3,11	63,35	71,13	45,06	-	-	-	1,40	8,20	71,55	5,87	-	416,33
9	2,83	6,08	86,68	74,90	64,93	0	-	-	2,00	0,00	0,00	0,00	0	880,47
10	0,00	12,14	79,79	66,42	53,00	-	-	-	3,00	3,50	82,85	2,90	-	469,39
11	0,00	1,55	41,73	44,52	18,58	-	-	-	0,67	0,00	0,00	0,00	-	353,74
12	1,25	2,76	82,16	70,58	57,99	0	-	-	1,25	0,00	0,00	0,00	0	479,59
13	3,80	1,59	73,45	60,58	44,49	0	-	-	0,60	16,30	82,36	13,42	0	473,47
14	0,00	0,40	7,79	65,18	5,08	-	-	-	0,25	0,90	65,44	0,59	-	377,55
15	2,20	11,78	85,05	103,80	88,27	0	-	-	1,60	36,50	76,08	27,77	0	497,96
16	0,00	0,00	9,06	56,27	5,10	0	-	1	6,80	4,90	67,96	3,33	1	530,61
17	1,14	0,40	31,92	53,92	17,21	-	-	-	0,00	52,27	81,79	42,75	-	58,31
18	1,14	3,87	10,23	46,97	4,81	-	0	0	0,67	1,40	77,07	1,08	0	340,14
19	1,67	0,81	1,08	54,58	0,59	0	-	-	0,83	0,00	0,00	0,00	0	520,41
20	5,00	7,79	43,62	73,45	32,04	-	0	0	1,33	2,20	87,20	1,92	0	564,63
21	1,50	1,37	89,25	63,19	56,39	-	0	-	0,50	4,90	91,68	4,49	0	295,92
22	1,63	7,94	29,10	59,42	17,29	-	0	-	0,38	0,00	0,00	0,00	0	397,96
23	3,00	13,06	48,88	80,62	39,41	-	0	-	0,60	70,93	90,18	63,96	1	375,51
24	0,67	3,56	89,31	74,85	66,85	-	-	-	1,17	54,01	70,07	37,85	-	272,11
25	1,00	5,80	76,99	97,81	75,31	-	0	-	0,67	1,40	61,06	0,85	0	707,48
26	0,00	1,17	79,11	49,33	39,02	-	0	-	0,85	18,63	62,01	11,55	0	289,12
27	0,00	15,12	91,97	119,00	109,44	0	-	-	1,50	69,40	79,86	55,42	0	438,78
28	0,00	29,97	90,51	100,25	90,74	-	-	-	1,60	44,70	70,19	31,37	-	326,53
29	0,00	20,36	81,11	84,34	68,40	0	-	1	0,67	52,90	88,53	46,83	0	285,71
30	0,00	6,82	75,00	124,75	93,56	0	-	-	0,33	0,00	0,00	0,00	0	326,53
31	0,00	0,74	8,33	53,66	4,47	0	-	-	1,33	18,50	77,26	14,29	0	693,88
32	0,67	13,19	82,38	96,98	79,89	0	-	-	2,50	11,00	70,40	7,74	1	380,95
33	0,00	1,45	12,93	64,40	8,32	-	-	-	0,17	0,00	0,00	0,00	-	965,99
34	0,83	3,54	91,20	90,41	82,45	-	-	-	0,10	41,20	94,23	38,82	-	453,06
35	1,20	1,22	86,52	58,82	50,90	-	0	-	1,60	41,30	61,15	25,26	1	514,29
36	0,00	7,15	94,88	80,18	76,07	0	-	-	3,29	73,10	77,47	56,63	0	507,29
37	0,00	2,25	74,27	78,65	58,42	0	-	-	1,33	51,00	75,91	38,71	0	448,98
38	3,00	1,67	92,70	61,08	56,62	-	-	-	1,00	37,50	67,95	25,48	-	183,67
39	0,40	0,29	86,90	69,78	60,64	-	0	-	2,00	37,80	69,88	26,42	0	563,27
40	0,71	1,14	71,05	84,20	59,82	0	-	-	2,00	0,40	61,96	0,25	0	763,85
41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0	783,67
42	0,00	0,00	9,83	49,57	4,87	-	0	0	0,78	3,20	71,84	2,30	0	530,61
43	1,13	5,71	76,70	104,38	80,06	-	-	1	3,38	44,20	80,17	35,44	-	632,65
44	1,00	24,83	78,52	119,75	94,03	0	-	1	1,38	36,20	78,23	28,32	0	678,57
45	0,00	6,99	7,08	53,49	3,79	0	-	-	2,22	0,80	75,10	0,60	0	916,10
46	0,50	0,99	66,52	82,81	55,08	0	-	-	3,17	8,00	57,05	4,56	1	401,36
47	0,00	4,43	33,39	79,23	26,46	0	-	-	0,63	2,90	62,99	1,83	1	1142,86
48	0,00	6,96	36,70	61,41	22,54	-	0	-	0,33	36,40	75,49	27,48	0	285,71
49	0,67	1,14	37,09	61,39	22,77	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	-	510,13
50	5,00	17,23	82,77	113,87	94,24	-	0	-	1,57	0,00	0,00	0,00	0	717,20

LEGENDA:

Galectina citoplasm. (expressão citoplasmática da galectina-3);

Galec. tecido normal (expressão citoplasmática da galectina-3 no tecido normal):
0=negativa 1=positiva;

Galec. bócio (expressão citoplasmática da galectina-3 no bócio adenomatoso):
0=negativa 1=positiva;

Galec. tireoidite (expressão da galectina-3 no citoplasma dos linfócitos):

0=negativa 1=positiva;

Caspase tecido normal (expressão citoplasmática da caspase-3 no tecido normal):

0=negativa 1=positiva;

CD-34: densidade de microvasos

(continua)

(continuação)

n	Galectina IP nucléolo n/CGA	Galectina IP núcleo (%)	Galectina citoplasm. IP (%)	Galectina citoplasm. ItE (uo/μm ²)	Galectina citoplasm. IE (uo/μm ²)	Galec. tecido normal	Galec. bócio	Galec. tireoi dite	Ki-67 n/CGA	Caspase IP (%)	Caspase ItE (uo/μm ²)	Caspase IE (uo/μm ²)	Caspase tecido normal	CD-34 n/mm ²
51	0,00	11,10	68,20	74,74	50,97	-	0	-	0,00	0,60	79,25	0,48	0	428,57
52	0,00	1,05	9,56	69,39	6,63	-	0	-	0,25	0,00	0,00	0,00	0	352,04
53	1,25	10,57	85,81	109,72	94,15	-	0	-	0,38	49,90	72,84	36,35	0	625,85
54	4,43	3,33	55,53	48,29	26,82	-	-	-	1,00	0,60	78,57	0,47	-	297,38
55	12,00	10,68	89,05	75,63	67,35	0	-	0	1,00	28,90	65,22	18,85	0	416,33
56	0,00	16,10	83,03	101,31	84,11	-	-	1	5,14	0,00	0,00	0,00	-	396,50
57	0,00	0,00	36,13	60,41	21,83	0	-	-	0,18	25,60	67,71	17,33	0	367,35
58	0,00	0,00	93,64	43,15	40,40	0	-	-	0,75	38,70	65,87	25,49	0	906,12
59	0,00	2,27	8,83	40,53	3,58	0	-	-	0,50	0,00	0,00	0,00	0	989,80
60	0,00	0,00	85,26	55,18	47,05	-	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0	81,63
61	0,00	1,11	30,36	46,66	14,17	-	0	-	0,20	0,10	36,22	0,04	0	253,06
62	0,83	10,02	73,35	105,66	77,49	0	-	1	1,33	7,00	68,78	4,81	0	462,59
63	0,00	0,17	42,45	50,88	21,60	0	-	-	0,40	0,00	0,00	0,00	0	465,31
64	0,00	3,99	63,09	113,13	71,37	-	0	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0	523,81
65	0,00	4,71	85,61	105,64	90,44	-	0	1	16,00	78,67	75,25	59,20	0	403,06
66	0,00	10,15	55,80	65,45	36,52	-	0	-	0,71	66,72	78,94	52,67	0	478,13
67	0,00	2,51	67,00	85,10	57,01	-	-	-	4,40	21,50	69,22	14,88	-	142,86
68	0,67	2,75	66,50	80,60	53,60	-	0	-	0,50	0,30	76,67	0,23	0	850,34
69	0,00	30,37	93,95	95,07	89,32	0	-	0	0,00	50,10	58,85	29,48	0	646,26
70	0,00	1,12	60,13	57,62	34,65	0	-	0	0,17	3,20	62,58	2,00	0	362,24
71	0,00	3,05	73,59	67,63	49,77	0	-	-	0,00	28,60	71,57	20,47	0	473,47
72	0,00	0,80	78,28	48,47	37,94	-	0	-	0,40	28,50	59,80	17,04	0	759,18
73	0,00	7,31	80,21	82,60	66,26	-	-	-	1,33	0,00	0,00	0,00	-	414,97
74	0,00	1,57	15,06	75,16	11,32	0	-	0	0,27	0,20	76,09	0,15	0	359,93
75	0,00	3,92	76,23	96,57	73,61	-	0	-	0,22	19,10	64,71	12,36	0	122,45
76	0,00	0,74	25,09	55,22	13,86	-	-	-	0,25	0,00	0,00	0,00	-	459,18
77	1,00	26,46	73,27	124,52	91,23	-	0	-	0,50	26,30	85,31	22,44	1	219,39
78	1,50	7,94	74,24	104,34	77,46	0	-	1	0,33	12,80	62,00	7,94	0	727,89
79	0,00	3,11	32,14	55,74	17,91	0	-	0	0,67	0,00	0,00	0,00	0	367,35
80	0,00	0,00	97,33	76,12	74,09	-	-	-	1,25	62,67	63,23	39,63	-	183,67
81	0,00	0,18	30,79	35,50	10,93	-	-	-	0,25	0,30	58,20	0,17	-	147,96
82	0,00	11,00	54,00	98,43	53,15	-	0	-	0,63	27,70	71,97	19,93	0	545,92
83	0,40	1,29	46,29	67,37	31,19	0	-	-	1,20	0,00	0,00	0,00	0	440,82
84	0,00	2,52	9,52	56,62	5,39	0	-	-	0,40	0,00	0,00	0,00	0	628,57
85	0,00	0,00	17,68	47,34	8,37	0	-	0	0,20	0,00	0,00	0,00	0	628,57
86	1,43	41,65	61,26	124,48	76,26	0	-	-	0,71	2,00	62,65	1,25	0	513,12
87	0,00	0,00	49,95	50,89	25,42	0	-	1	0,29	3,60	59,72	2,15	0	81,63
88	0,00	0,77	23,43	60,94	14,28	-	-	-	0,63	0,30	76,02	0,23	-	617,35
89	1,00	37,19	68,69	111,04	76,28	-	0	-	0,63	38,80	83,84	32,53	0	362,24
90	0,00	0,00	68,50	68,34	46,82	-	-	1	3,75	26,60	73,41	19,53	-	714,29
91	0,00	0,00	33,93	51,35	17,42	-	-	-	0,50	34,90	71,27	24,87	-	316,33
92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0	-	0,30	0,00	0,00	0,00	0	419,83
93	0,00	7,89	78,56	75,57	59,37	0	-	-	0,70	51,50	80,51	41,46	1	661,22
94	0,00	18,02	65,49	78,31	51,28	-	0	-	1,83	18,80	63,02	11,85	0	93,29
95	0,00	9,36	83,67	105,10	87,94	-	0	-	1,40	4,70	71,91	3,38	0	359,18
96	0,00	0,00	16,11	46,12	7,43	-	0	-	0,00	9,40	67,12	6,31	0	431,49
97	0,00	1,76	63,03	78,31	49,36	0	-	0	0,88	0,00	0,00	0,00	0	474,49
98	1,50	21,97	95,99	100,96	96,91	0	-	-	0,33	48,10	74,79	35,97	1	367,35
99	0,00	3,63	84,58	77,27	65,36	0	-	-	0,60	0,80	82,98	0,66	1	408,16
100	0,00	3,00	38,85	51,83	20,14	0	-	-	0,80	2,40	102,23	2,45	0	195,92
101	0,00	0,00	50,71	57,72	29,27	0	-	-	0,33	29,30	68,98	20,21	0	823,13
102	0,00	0,00	66,76	58,51	39,06	-	-	-	0,82	51,90	68,17	35,38	-	122,45
103	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0	-	0,18	0,00	0,00	0,00	1	624,49
104	0,00	0,00	74,03	53,17	39,36	0	-	-	0,20	17,60	62,35	10,97	0	212,24
105	5,25	20,78	66,42	87,07	57,83	-	0	-	0,75	15,30	62,21	9,52	0	77,55
106	5,88	18,58	74,59	95,69	71,37	-	0	1	0,88	13,40	71,66	9,60	1	316,33
107	3,29	21,12	88,04	91,70	80,74	-	0	-	0,57	30,70	70,64	21,69	0	501,46
108	0,67	15,54	15,54	86,35	69,63	-	-	-	6,00	14,80	78,46	11,61	-	285,71
109	0,00	2,76	54,94	56,25	30,91	-	0	-	1,60	0,00	0,00	0,00	0	367,35

LEGENDA:

Galectina citoplasm. (expressão citoplasmática da galectina-3);**Galec. tecido normal** (expressão citoplasmática da galectina-3 no tecido normal):
0=negativa 1=positiva;**Galec. bócio** (expressão citoplasmática da galectina-3 no bócio adenomatoso):
0=negativa 1=positiva;**Galec. tireoidite** (expressão da galectina-3 citoplasma dos linfócitos):

0=negativa 1=positiva;

Caspase tecido normal (expressão citoplasmática da caspase-3 no tecido normal):

0=negativa 1=positiva;

CD-34: densidade de microvasos.

8.4. ANEXO D

Tabela A9 – Comparação das características clínicas entre o grupo de doentes sem metástase (controle) e o grupo de doentes com metástase linfática ou hematogênica (caso), ao final do seguimento.

	Grupo		p
	Sem metástase	Com metástase	
Características clínicas pré-operatórias			
Idade (anos)	45,75 ± 13,83	42,40 ± 16,90	0,2770 ^a
Gênero:			0,2450 ^b
Feminino	90,9% (40/44)	84,2% (48/57)	
Masculino	9,1% (4/44)	15,8% (9/57)	
Origem étnica:			0,0480 ^{c *}
Caucasiano	67,6% (23/34)	88,5% (46/52)	
Mestiço	29,4% (10/34)	9,6% (5/52)	
Negro	0,0% (0/34)	1,9% (1/52)	
Oriental	2,9% (1/34)	0,0% (0/52)	
Queixa principal:			0,1800 ^c
Nódulo cervical	34,1% (15/44)	50,0% (28/56)	
Aumento do volume cervical	22,7% (10/44)	28,5% (16/56)	
Aumento da tireóide	9,0% (4/44)	1,8% (1/56)	
Disfagia / odinofagia	11,4% (5/44)	12,5% (7/56)	
Disfonia	2,3% (1/44)	1,8% (1/56)	
Dispneia	2,3% (1/44)	1,8% (1/56)	
Dor na região cervical	2,3% (1/44)	0,0% (0/56)	
Obesidade	2,3% (1/44)	0,0% (0/56)	
Sem queixa	13,6% (6/44)	3,6% (2/56)	
Duração da queixa (meses)	71,31 ± 127,69	32,08 ± 50,24	0,0490 ^{d *}
Antecedente pessoal presente:	56,8% (25/44)	33,9% (19/56)	0,0670 ^c
Uso do T4 no pré-operatório	2,3% (1/44)	3,6% (2/56)	0,6640 ^b
Uso do PTU no pré-operatório	6,8% (3/44)	7,1% (4/56)	0,6330 ^b
Exame físico da tireóide:			0,9950 ^c
Sem bócio	11,4% (5/44)	10,7% (6/56)	
Bócio Uninodular	72,7% (32/44)	71,4% (40/56)	
Bócio multinodular	11,4% (5/44)	12,5% (7/56)	
Bócio difuso	4,5% (2/44)	5,4% (3/56)	
Exame físico de cadeias linfonodais:			0,0001 ^{b **}
Linfonodo aumentado	4,5% (2/44)	32,1% (18/56)	

a) teste-*t* de Student; b) teste exato de Fisher; c) teste do qui-quadrado de Pearson; d) teste de Mann-whitney; * significante a 0,05; ** significante a 0,001.

(continua)

(continuação)

	Grupos		
	Sem metástase	Com metástase	p
Características clínicas pré-operatórias			
T4 sérico pré-operatório (ng/dl)	1,28 ± 1,22	1,04 ± 0,37	0,281 ^a
TSH sérico pré-operatório (mcU/ml)	1,43 ± 1,17	2,19 ± 3,02	0,196 ^a
TGB sérica pré-operatória (ng/ml)	291,47 ± 336,20	422,34 ± 669,40	0,587 ^a
Anticorpo Anti-TPO positivo	10,0% (2/20)	8,3% (1/12)	0,690 ^b
Anticorpo Anti-TGB positivo	7,7% (3/39)	19,5% (8/41)	0,113 ^b
Exame ultrassonográfico:			
Diâmetro do maior nódulo (mm)	24,96 ± 15,43	21,62 ± 10,82	0,363 ^a
Nódulo hipoecogênico	51,9% (14/27)	58,8% (20/34)	0,177 ^c
Microcalcificação	11,1% (3/27)	26,5% (9/34)	0,295 ^c
Linfonodos aumentados	7,4% (2/27)	50,0% (17/34)	0,001 ^{b *}
Exame citológico pré-operatório:			0,005 ^{c *}
Compatível com Ca. papilífero	53,1% (17/32)	59,1% (26/44)	
Padrão folicular	34,4% (11/32)	9,1% (4/44)	
Bócio colóide	12,5% (4/32)	6,8% (3/44)	
Linfonodo Positivo	0,0% (0/32)	22,7% (10/44)	
outros	0,0% (0/32)	2,3% (1/44)	
Características clínicas pós-operatórias			
Pesquisa de corpo inteiro:			0,004 ^c
Captação no leiro tireóideo	93,2% (41/44)	64,3% (36/56)	
Captação cervical lateral	0,0% (0/44)	14,3% (8/56)	
Outras regiões	0,0% (0/44)	7,1% (4/56)	
Média de captação / 24 horas (%)	2,15 ± 1,39	1,70 ± 1,43	0,189 ^a
Radioiodoterapia complementar:			
Doentes que realizaram	43,2% (19/44)	100,0% (56/56)	0,0001 ^{b **}
Média da dose total (mCi)	145,22 ± 83,97	226,74 ± 165,91	0,056 ^a
Tempo entre operação e RIT (meses)	15,11 ± 9,56	20,59 ± 22,48	0,195 ^a
Uso do T4 no pós-operatório (µg)	142,69 ± 46,34	165,76 ± 54,86	0,044 ^{a *}
TSH sérico pós-operatório acima	41,5% (17/41)	58,5% (24/47)	0,246 ^b
Curva de TGB ascendente	2,3% (1/44)	26,8% (15/56)	0,001 ^b

a) teste-*t* de Student; b) teste exato de Fisher; c) teste do qui-quadrado de Pearson; d) teste de Mann-Whitney;
 * significante a 0,05; ** significante a 0,001.

Figura A 1 – Número de doentes dos grupos com e sem metástase (linfática ou hematogênica) em função do índice de positividade nucleolar da galectina-3.

Tabela A10 – Correlação dos índices de expressão citoplasmática da galectina-3 entre si e com os índices de positividade nucleolar e nucleoplasmática.

		Galec. cit. IP (%)	Galec. cit. ItE (uo/ μ m ²)	Galec. cit. IE (uo/ μ m ²)	Galec. núcleo- lo n/CGA	Galec. núcleo IP (%)
Galec. cit. IP (%)	Coef. p	1,000	0,594** 0,000	0,872** 0,000	0,251** 0,008	0,391** 0,000
Galec. cit. ItE (uo/ μ m ²)	Coef. p	0,594** 0,000	1,000	0,846** 0,000	0,169 0,080	0,630** 0,000
Galec. cit. IE (uo/ μ m ²)	Coef. p	0,872** 0,000	0,846** 0,000	1,000	0,234* 0,014	0,601** 0,000
Galec. núcleo- lo n/CGA	Coef. p	0,251** 0,008	0,169 0,080	0,234* 0,014	1,000	0,272** 0,004
Galec. Núcleo IP (%)	Coef. p	0,391** 0,000	0,630** 0,000	0,601** 0,000	0,272** 0,004	1,000

Coef. = coeficiente de correlação de Pearson.

** Correlação significativa a 0,01.

* Correlação significativa a 0,05.

Legenda:

Galec. cit. IP: índice de positividade citoplasmática da galectina-3;

Galec. cit. ItE: intensidade de expressão citoplasmática da galectina-3;

Galec. cit. IE: índice de expressão citoplasmática da galectina-3;

**Galec. núcleo-
lo IP:** índice de positividade nucleolar da galectina-3;

**Galec. núcleo.
IP:** índice de positividade nucleoplasmática da galectina-3.

Tabela A11 – Correlação dos índices de expressão imunohistoquímica dos marcadores entre si no grupo de doentes sem metástase.

		Galec. cit. IE (uo/ μ m ²)	Galec. nucléolo (n/CGA)	Galec. núcleo IP (%)	Ki-67 (n/CGA)	Casp. cit.IE (uo/ μ m ²)	CD-34 (n/mm ²)
Galec. cit. IE (uo/ μ m ²)	Coef. p	1,000	0,345* 0,022	0,593** 0,000	0,289 0,057	0,523** 0,000	-0,196 0,203
Galec. nucléolo (n/CGA)	Coef. p	0,345* 0,022	1,000	0,503** 0,001	-0,070 0,649	0,030 0,847	-0,136 0,378
Galec. núcleo IP (%)	Coef. p	0,593** 0,000	0,503** 0,001	1,000	-0,007 0,965	0,285 0,061	-0,142 0,358
Ki-67 (n/CGA)	Coef. p	0,289 0,057	-0,070 0,649	-0,007 0,965	1,000	0,459** 0,002	0,038 0,804
Casp. cit IE (uo/ μ m ²)	Coef. p	0,523** 0,000	0,030 0,847	0,285 0,061	0,459** 0,002	1,000	-0,117 0,450
CD-34 (n/mm ²)	Coef. p	-0,196 0,203	-0,136 0,378	-0,142 0,358	0,038 0,804	-0,117 0,450	1,000

Coef. = coeficiente de correlação de Pearson.

** Correlação significativa a 0,01.

* Correlação significativa a 0,05.

Legenda:

Galec. cit. IE: índice de expressão citoplasmática da galectina-3;

Galec. nucléolo. IP: índice de positividade nucleolar da galectina-3;

Galec. núcleo. IP: índice de positividade nucleoplasmática da galectina-3.

Casp. cit. IE: índice de expressão citoplasmática da caspase-3;

CD-34: densidade de microvasos.

Tabela A12 – Correlação dos índices de expressão imunohistoquímica dos marcadores entre si no grupo de doentes com metástase.

		Galec. cit. IE (uo/ μ m ²)	Galec. nucléolo (n/CGA)	Galec. núcleo IP (%)	Ki-67 (n/CGA)	Casp. cit. IE (uo/ μ m ²)	CD-34 (n/mm ²)
Galec. cit. IE (uo/ μ m ²)	Coef. p	1,000	0,226 0,091	0,649** 0,000	0,223 0,095	0,370** 0,005	0,052 0,703
Galec. nucléolo (n/CGA)	Coef. p	0,226 0,091	1,000	0,245 0,066	-0,003 0,981	0,261* 0,050	-0,009 0,945
Galec. núcleo IP (%)	Coef. p	0,649** 0,000	0,245 0,066	1,000	0,274* 0,039	0,402** 0,002	0,101 0,455
Ki-67 (n/CGA)	Coef. p	0,223 0,095	-0,003 0,981	0,274* 0,039	1,000	0,084 0,535	-0,105 0,438
Casp. cit. IE (uo/ μ m ²)	Coef. p	0,370** 0,005	0,261* 0,050	0,402** 0,002	0,084 0,535	1,000	-0,155 0,250
CD-34 (n/mm ²)	Coef. p	0,052 0,703	-0,009 0,945	0,101 0,455	-0,105 0,438	-0,155 0,250	1,000

Coef. = coeficiente de correlação de Pearson.

** Correlação significativa a 0,01.

* Correlação significativa a 0,05.

Legenda:

Galec. cit. IE: índice de expressão citoplasmática da galectina-3;

Galec. nucléolo. IP: índice de positividade nucleolar da galectina-3;

Galec. núcleo. IP: índice de positividade nucleoplasmática da galectina-3.

Casp. cit. IE: índice de expressão citoplasmática da caspase-3;

CD-34: densidade de microvasos.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. *Tumours of the thyroid gland*. 3a ed. Washington DC: AFIP; 1990.
2. LiVolsi VA. Well differentiated thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1996;8(5):281-8.
3. Moosa M, Mazzaferri EL. Disorders of the thyroid gland. In: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE. *Otolaryngology & head and neck surgery*. 3a ed. St. Louis: Mosby; 1998. p. 2450-79.
4. Sessions RB, Taylor T, Roller CA, O'Malley BB. Cancer of the thyroid gland. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong Wk. *Head and neck cancer. A multidisciplinary Approach*. Philadelphia: Lippincott - Raven; 1999. p. 799-870.
5. Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, et al. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer*. 2000;89(1):202-17.
6. Bisi H, Fernandes VS, Rosalinda Y, De Camargo A, Longatto Filho A, Ruggeri GB, et al. Neoplastic and non-neoplastic thyroid lesions in surgical material: historical review of five decades in Sao Paulo, Brazil. *Tumori*. 1995;81(1):63-6.
7. AACE/AAES medical/surgical guidelines for clinical practice: management of thyroid carcinoma. American Association of Clinical Endocrinologists. American College of Endocrinology. *Endocr Pract*. 2001;7(3):202-20.
8. Haigh PI, Urbach DR, Rotstein LE. AMES prognostic index and extent of thyroidectomy for well-differentiated thyroid cancer in the United States. *Surgery*. 2004;136(3):609-16.
9. Ferraz AR, Araújo Fº VJF, Gonçalves AJ, Fava AS, Lima RA. Diagnóstico e tratamento do câncer da tireóide. *Projeto Diretrizes AMB/CFM* [online]. 2001

- april [cited 2005 dec 12]. Available from:
http://www.portalmedico.org.br/diretrizes/100_diretrizes/Cancer_Tireoide.pdf.
10. British Thyroid Association, Royal College of Physicians. *Guidelines for the management of thyroid cancer in adults* [online]. 2002 march [cited 2005 nov 11]. Available from: <http://www.british-thyroid-association.org/guidelines.htm>.
 11. Item 241: goitre et nodule thyroïdien. *Collège des Enseignants d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques* [online]. 2004 may [cited 2005 dec 18]. Available from: <http://www.endocrino.net>.
 12. Shaha AR, Jaffe BM. Completion thyroidectomy: a critical appraisal. *Surgery*. 1992;112(6):1148-52; discussion 1152-3.
 13. Palme CE, Waseem Z, Raza SN, Eski S, Walfish P, Freeman JL. Management and outcome of recurrent well-differentiated thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130(7):819-24.
 14. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of nodal and distant metastasis based on histologic varieties in differentiated carcinoma of the thyroid. *Am J Surg*. 1996;172(6):692-4.
 15. Mazzaferri EL. An overview of the management of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid*. 1999;9(5):421-7.
 16. Carneiro PC. Limitação da interpretação de punção aspirativa de nódulos de tireóide com quadro citológico de "tumor folicular". In: Resumos do II Encontro Brasileiro de Tireóide; 1987 outubro; São Paulo; 1987. p. 211-18.
 17. Tuttle RM, Lemar H, Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid*. 1998;8(5):377-83.
 18. Shneider AB, Ron E, Siperstein AE, Clark OH, Mazzaferri EL. Carcinoma of follicular epithelium. In: Braverman LE, Utiger RD. *Werner and Ingbar's the thyroid. A fundamental and clinical text*. 7a ed. Philadelphia: Lippincott - Raven; 1996. p. 902-945.
 19. Tomimori EK, Camargo RY, Bisi H, Medeiros-Neto G. Combined ultrasonographic and cytological studies in the diagnosis of thyroid nodules. *Biochimie*. 1999;81(5):447-52.
 20. Suen KC, Quenville NF. Fine needle aspiration biopsy of the thyroid gland: a study of 304 cases. *J Clin Pathol*. 1983;36(9):1036-45.

21. Castro MR, Gharib H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med.* 2005;142(11):926-31.
22. Wiseman SM, Baliski C, Irvine R, Anderson D, Wilkins G, Filipenko D, et al. Hemithyroidectomy: the optimal initial surgical approach for individuals undergoing surgery for a cytological diagnosis of follicular neoplasm. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(3):425-32.
23. Shaha AR. Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope.* 2004;114(3):393-402.
24. Segal K, Friedental R, Lubin E, Shvero J, Sulkes J, Feinmesser R. Papillary carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113(4):356-63.
25. Noguchi M, Kumaki T, Taniya T, Segawa M, Nakano T, Ohta N, et al. Impact of neck dissection on survival in well-differentiated thyroid cancer: a multivariate analysis of 218 cases. *Int Surg.* 1990;75(4):220-4.
26. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(2):414-24.
27. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc.* 1986;61(12):978-96.
28. Shah JP, Loree TR, Dharker D, Strong EW, Begg C, Vlamis V. Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg.* 1992;164(6):658-61.
29. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet.* 2001;357(9269):1644-50.
30. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de imuno-histoquímica.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.
31. Araújo filho VJF. *Carcinoma papilífero da tireóide localmente invasivo: estudo da angiogênese e dos fatores prognósticos* [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.
32. Friguglietti CUM, Mello ES, Castro IV, Silva Filho GB, Alves VAF. Metalloproteinase-9 immunoexpression and angiogenesis in thyroid follicular

- neoplasms: relation to clinical and histopathologic features. *Head Neck*. 2000;22(4):373-9.
33. Silva Filho GB, Maciel RM, Takahashi MH, Alberti VN, Castro IV, Saldiva PH, et al. 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*. 1999;21(8):723-7.
 34. Gasbarri A, Martegani MP, Del Prete F, Lucante T, Natali PG, Bartolazzi A. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol*. 1999;17(11):3494-502.
 35. McGregor GI, Luoma A, Jackson SM. Lymph node metastases from well-differentiated thyroid cancer. A clinical review. *Am J Surg*. 1985;149(5):610-2.
 36. Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, et al. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer*. 1979;15(8):1033-41.
 37. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery*. 1993;114(6):1050-7; discussion 1057-8.
 38. Cady B. Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition. *Surg Oncol Clin N Am*. 1998;7(4):633-44.
 39. Beasley NJ, Lee J, Eski S, Walfish P, Witterick I, Freeman JL. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128(7):825-8.
 40. Asakawa H, Kobayashi T, Komoike Y, Tamaki Y, Matsuzawa Y, Monden M. Prognostic factors in patients with recurrent differentiated thyroid carcinoma. *J Surg Oncol*. 1997;64(3):202-6.
 41. Simpson WJ, McKinney SE, Carruthers JS, Gospodarowicz MK, Sutcliffe SB, Panzarella T. Papillary and follicular thyroid cancer. Prognostic factors in 1,578 patients. *Am J Med*. 1987;83(3):479-88.
 42. Karayan L, Hadjadj S, Larsen CJ, Marechaud R, Kraimps JL. Update on differentiated thyroid carcinoma. *Bull Cancer*. 2002;89(1):113-23.
 43. Maciel RMB, Kimura ET, Cerutti JM. Patogênese dos tumores diferenciados da tireóide (papilífero e folicular). *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49(5):691-700.

44. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):213-20.
45. Nakabashi CC, Guimaraes GS, Michaluart P, Jr., Ward LS, Cerutti JM, Maciel RM. The expression of PAX8-PPARgamma rearrangements is not specific to follicular thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61(2):280-2.
46. Oler G, Ebina KN, Michaluart P, Jr., Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(4):509-11.
47. Klain M, Ricard M, Leboulleux S, Baudin E, Schlumberger M. Radioiodine therapy for papillary and follicular thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29 Suppl 2:S479-85.
48. Nascimento MC, Bisi H, Alves VA, Longatto-Filho A, Kanamura CT, Medeiros-Neto G. Differential reactivity for galectin-3 in Hurthle cell adenomas and carcinomas. *Endocr Pathol*. 2001;12(3):275-9.
49. Segura MEA, Magalhães AV. Galectin-3 immunostaining in thyroid neoplasms. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(5):341-46.
50. Rosa MP, Kanamura CT, Carvalho MB. Expressão de galectina-3 e citoqueratina 19 nas neoplasias epiteliais da glândula tireóidea e correlação histopatológica. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(1):61-70.
51. Stabenow E, Tavares MR, Ab'Saber AM, Parra-Cuentas ER, de Matos LL, Eher EM, et al. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. *Clinics*. 2005;60(3):233-40.
52. de Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira Facuri F, Assumpcao LV, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*. 2005;47(4):391-401.
53. Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, et al. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol*. 2000;31(4):428-33.

54. Gabius HJ, Brehler R, Schauer A, Cramer F. Localization of endogenous lectins in normal human breast, benign breast lesions and mammary carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1986;52(2):107-15.
55. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8.
56. Papotti M, Volante M, Saggiorato E, Deandreis D, Veltri A, Orlandi F. Role of galectin-3 immunodetection in the cytological diagnosis of thyroid cystic papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(4):515-21.
57. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, et al. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer*. 1999;85(11):2475-84.
58. Gasbarri A, Marchetti C, Iervasi G, Bottoni A, Nicolini A, Bartolazzi A, et al. From the bench to the bedside. Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid nodules. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(6-7):356-9.
59. Bernet VJ, Anderson J, Vaishnav Y, Solomon B, Adair CF, Saji M, et al. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic Acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(10):4792-6.
60. Martins L, Matsuo SE, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CU, Kimura ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(10):4806-10.
61. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med*. 1998;76(6):402-12.
62. Wang JL, Werner EA, Laing JG, Patterson RJ. Nuclear and cytoplasmic localization of a lectin-ribonucleoprotein complex. *Biochem Soc Trans*. 1992;20(2):269-74.
63. Wang L, Inohara H, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217(1):292-303.
64. Herrmann ME, LiVolsi VA, Pasha TL, Roberts SA, Wojcik EM, Baloch ZW. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(6):710-3.

65. Bisi H, Fernandes VS, de Camargo RY, Koch L, Abdo AH, de Brito T. The prevalence of unsuspected thyroid pathology in 300 sequential autopsies, with special reference to the incidental carcinoma. *Cancer*. 1989;64(9):1888-93.
66. Sakorafas GH, Giotakis J, Stafyla V. Papillary thyroid microcarcinoma: a surgical perspective. *Cancer Treat Rev*. 2005;31(6):423-38.
67. Taneri F, Kurukahvecioglu O, Ege B, Yilmaz U, Tekin E, Cifter C, et al. Prospective analysis of 518 cases with thyroidectomy in Turkey. *Endocr Regul*. 2005;39(3):85-90.
68. Kovacs GL, Gonda G, Vadasz G, Ludmany E, Uhrin K, Gorombey Z, et al. Epidemiology of thyroid microcarcinoma found in autopsy series conducted in areas of different iodine intake. *Thyroid*. 2005;15(2):152-7.
69. Barraclough BM, Barraclough BH. Ultrasound of the thyroid and parathyroid glands. *World J Surg*. 2000;24(2):158-65.
70. Chammas M. *Contribuição do dúplex-Doppler colorido ao estudo dos nódulos da tireóide*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.
71. Jogai S, Al-Jassar A, Temmim L, Dey P, Adesina AO, Amanguno HG. Fine needle aspiration cytology of the thyroid: a cytohistologic study with evaluation of discordant cases. *Acta Cytol*. 2005;49(5):483-8.
72. Souza DAT, Freitas HMP, Muzzi M, Carvalho ACP, Marchiori E. Punção aspirativa por agulha fina guiada por ultra-sonografia de nódulos tireoidianos: estudo de 63 casos. *Radiol Bras*. 2004;37(5):333-5.
73. Rosa JC, Romão LA, Piovesan JB, Ferraz EVAP, Oliveira LL. Câncer da tireóide: o comprometimento bilateral constitui fator de risco? Revisão de 473 casos operados e seguidos até 35 anos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000;44(2):144-7.
74. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*. 1994;97(5):418-28.
75. Caron NR, Clark OH. Papillary thyroid cancer: surgical management of lymph node metastases. *Curr Treat Options Oncol*. 2005;6(4):311-22.
76. Sturniolo G, Lo Schiavo MG, D'Alia C, Tonante A, Gagliano E, Taranto F, et al. Le traitement chirurgical des microcarcinomes thyroïdiens. *Mém L'Acad Nat Chir*. 2004;3(1):47-52.

77. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Differentiated thyroid cancer presenting initially with distant metastasis. *Am J Surg*. 1997;174(5):474-6.
78. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis. *Head Neck*. 1996;18(2):127-32.
79. Sato N, Oyamatsu M, Koyama Y, Emura I, Tamiya Y, Hatakeyama K. Do the level of nodal disease according to the TNM classification and the number of involved cervical nodes reflect prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland? *J Surg Oncol*. 1998;69(3):151-5.
80. Leboulleux S, Rubino C, Baudin E, Caillou B, Hartl DM, Bidart JM, et al. Prognostic factors for persistent or recurrent disease of papillary thyroid carcinoma with neck lymph node metastases and/or tumor extension beyond the thyroid capsule at initial diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(10):5723-9.
81. Simon D, Goretzki PE, Witte J, Roher HD. Incidence of regional recurrence guiding radicality in differentiated thyroid carcinoma. *World J Surg*. 1996;20(7):860-6.
82. Schuh D, Steidl R, Voss K. The differential diagnosis of follicular adenomas and carcinomas in fine needle biopsies of the thyroid gland by means of automatic image analysis. *Zentralbl Allg Pathol*. 1980;124(6):557-60.
83. Tennvall J, Biorklund A, Moller T, Ranstam J, Akerman M. Prognostic factors of papillary, follicular and medullary carcinomas of the thyroid gland. Retrospective multivariate analysis of 216 patients with a median follow-up of 11 years. *Acta Radiol Oncol*. 1985;24(1):17-24.
84. Cady B. Risk factor analysis in differentiated thyroid cancer. *Cancer*. 1979;43:810-9.
85. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head Neck*. 1998;20(1):26-30.
86. Shaha AR. Thyroid cancer: extent of thyroidectomy. *Cancer Control*. 2000;7(3):240-5.
87. Shaha AR. Management of the neck in thyroid cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 1998;31(5):823-31.

88. Kim MK, Mandel SH, Baloch Z, Livolsi VA, Langer JE, Didonato L, et al. Morbidity following central compartment reoperation for recurrent or persistent thyroid cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(10):1214-6.
89. Grebe SK, Hay ID. Thyroid cancer nodal metastases: biologic significance and therapeutic considerations. *Surg Oncol Clin N Am.* 1996;5(1):43-63.
90. Noguchi S, Murakami N, Yamashita H, Toda M, Kawamoto H. Papillary thyroid carcinoma: modified radical neck dissection improves prognosis. *Arch Surg.* 1998;133(3):276-80.
91. Noguchi S, Murakami N. The value of lymph-node dissection in patients with differentiated thyroid cancer. *Surg Clin North Am.* 1987;67(2):251-61.
92. Iida F. Recent advances in surgical treatment of thyroid carcinoma [abstract]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1988;89(9):1343-6.
93. Cougard P, Peix JL, Kraimps JL. [Low-risk papillary thyroid cancer. What is the procedure of choice for thyroidectomy and lymph node resection?]. *Ann Chir.* 2005;130(6-7):411-3.
94. Sulman C, Carpentier P. Cancer de la thyroïde. *Cancers: évaluation, traitement et surveillance.* JM Andrieu & P Colonna Ed. ESTEM [online]. 1997 [cited 2006 jan 22]. Available from: <http://www.medespace.com/cancero/doc/thyroid.html>.
95. Vogelsang H, Bruckner T, Scheidhauer K, Schwaiger M, Siewert JR. Reoperation for thyroid cancer. *Chirurg.* 2005;76(3):238-49.
96. Pereira JA, Jimeno J, Miquel J, Iglesias M, Munne A, Sancho JJ, et al. Nodal yield, morbidity, and recurrence after central neck dissection for papillary thyroid carcinoma. *Surgery.* 2005;138(6):1095-100, discussion 1100-1.
97. Hamming JF, van de Velde CJ, Goslings BM, Fleuren GJ, Hermans J, Delemarre JF, et al. Peroperative diagnosis and treatment of metastases to the regional lymph nodes in papillary carcinoma of the thyroid gland. *Surg Gynecol Obstet.* 1989;169(2):107-14.
98. Schindler AM. Occult papillary thyroid cancer. *Schweiz Med Wochenschr.* 1982;112(10):339-44.
99. Kaczka K, Wojcik I, Matejkowska M, Kuzdak K, Pomorski L. Lymph node metastases of papillary thyroid cancer in immunohistochemical and molecular examination-preliminary report. *Endokrynol Pol.* 2005;56(2):160-7.

100. Roques F, Michel P, Goldstone AR, Nashef SA. The logistic EuroSCORE. *Eur Heart J*. 2003;24(9):882-3.
101. Nashef SA, Roques F, Hammill BG, Peterson ED, Michel P, Grover FL, et al. Validation of European System for Cardiac Operative Risk Evaluation (EuroSCORE) in North American cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002;22(1):101-5.
102. Souza MB, Tomikawa VO, Oliveira BFT, Polati M. Uso da rede neural artificial no planejamento cirúrgico da correção do estrabismo. *Arq Bras Oftalmol*. 2004;67(3):459-62.
103. Lundgren CI, Hall P, Dickman PW, Zedenius J. Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: a population-based, nested case-control study. *Cancer*. 2006;106(3):524-31.
104. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc; 1989.
105. Bartolazzi A, Papotti M, Orlandi F. Methodological considerations regarding the use of galectin-3 expression analysis in preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(2):950; author reply 950-1.
106. Noguchi M, Yagi H, Earashi M, Kinoshita K, Miyazaki I, Mizukami Y. Recurrence and mortality in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Int Surg*. 1995;80(2):162-6.
107. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*. 1988;96(5):379-94.
108. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plenat F, et al. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):656-8.
109. Borra RC. *ImageLab - sistema de processamento e análise de imagem*. São Paulo: Softium-Sistemas de Informática; 2000.
110. Holschbach A, Kriete A, Schaffer R. Differential diagnosis of papillary carcinomas of the thyroid, using image analysis and three dimensional reconstruction from serial sections. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1990;74:270-4.
111. Jensen MH, Davis RK, Derrick L. Thyroid cancer: a computer-assisted review of 5287 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990;102(1):51-65.

112. Salmon I, Kiss R, Franc B, Gasperin P, Heimann R, Pasteels JL, et al. Comparison of morphonuclear features in normal, benign and neoplastic thyroid tissue by digital cell image analysis. *Anal Quant Cytol Histol*. 1992;14(1):47-54.
113. Tseleni S, Kavantzias N, Yova D, Alexandratou E, Karydakis V, Gogas J, et al. Findings of computerised nuclear morphometry of papillary thyroid carcinoma in correlation with known prognostic factors. *J Exp Clin Cancer Res*. 1997;16(4):401-6.
114. Gupta N, Sarkar C, Singh R, Karak AK. Evaluation of diagnostic efficiency of computerized image analysis based quantitative nuclear parameters in papillary and follicular thyroid tumors using paraffin-embedded tissue sections. *Pathol Oncol Res*. 2001;7(1):46-55.
115. Kavantzias N, Tseleni-Balafouta S, Davaris P. Computerized nuclear morphometry and quantitation of angiogenesis in thyroid neoplasms. *J Exp Clin Cancer Res*. 2002;21(2):247-54.
116. Zhu QY. Analysis of blood vessel invasion by cells of thyroid follicular carcinoma using image processing combined with immunohistochemistry [abstract]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1989;69(10):573-5, 40.
117. Borra RC, Andrade PM, Silva ID, Morgun A, Weckx LL, Smirnova AS, et al. The Th1 /Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(3):140-6.
118. Rald DP, Lage-Marques JL. In vitro evaluation of the effects of the interaction between irrigating solutions, intracanal medication and Er:YAG laser in dentin permeability of the endodontic system. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(3):278-85.
119. Rosal MA, Goncalves WJ, Alves MT, Baracat EC, de Lima GR. Histopathological and immunohistochemical analysis (proliferating cel nuclear antigen) of patients with invasive cervical carcinoma before and after radiotherapy and surgery. *Rev Assoc Med Bras*. 2002;48(1):32-5.
120. Silva Junior AN, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20(2):83-7.

121. Abdo-Banhos CR, Cordeiro JA, Rosa CS, Bicudo HE. Morphometric study by image analysis of Ag-stained nucleoli in thyroids bearing proliferating lesions. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2004;36(1):37-43.
122. Underwood RA, Gibran NS, Muffley LA, Usui ML, Olerud JE. Color subtractive-computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(10):1285-91.
123. Gordower L, Decaestecker C, Kacem Y, Lemmers A, Gusman J, Burchert M, et al. Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic tumours and related angiogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999;25(4):319-30.
124. D'Haene N, Maris C, Sandras F, Dehou MF, Remmelink M, Decaestecker C, et al. The differential expression of Galectin-1 and Galectin-3 in normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005;18(3):431-43.
125. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR, Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*. 1995;147(4):1016-28.
126. Harmon JM, Taber HW. Altered accumulation of a membrane protein unique to a membrane-deoxyribonucleic acid complex in a dna initiation mutant of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 1977;130(3):1224-33.
127. Powell JT. Purification and properties of lung lectin. Rat lung and human lung beta-galactoside-binding proteins. *Biochem J*. 1980;187(1):123-9.
128. Hsu DK, Kuwabara I, Fu-Tong L. Galectin-3 and regulation of cell function. *Transfus Med Hemother*. 2005;32:83-96.
129. Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem*. 1992;267(20):14167-74.
130. Krzeslak A, Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*. 2004;9(2):305-28.
131. Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(18):6452-6.
132. Sato S, Burdett I, Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway

- independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp Cell Res.* 1993;207(1):8-18.
133. Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med.* 1997;185(10):1851-8.
134. Akimoto Y, Hirabayashi J, Kasai K, Hirano H. Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. *Cell Tissue Res.* 1995;280(1):1-10.
135. Chiariotti L, Berlingieri MT, De Rosa P, Battaglia C, Berger N, Bruni CB, et al. Increased expression of the negative growth factor, galactoside-binding protein, gene in transformed thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Oncogene.* 1992;7(12):2507-11.
136. Hughes RC. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology.* 1994;4(1):5-12.
137. Chammas R, Jasiulionis MG, Ventura AM, Travassos LR, Brentani RR. Laminin-binding proteins in EJ-ras-transformed fibroblasts. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29(9):1141-9.
138. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(13):6737-42.
139. Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1673(1-2):75-93.
140. Califice S, Castronovo V, Bracke M, Van den Brule F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene.* 2004;23(45):7527-36.
141. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000;156(3):899-909.
142. John CM, Leffler H, Kahl-Knutsson B, Svensson I, Jarvis GA. Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(6):2374-83.
143. Lee YJ, Song YK. Cooperative interaction between interleukin 10 and galectin-3 against liver ischemia-reperfusion injury. *Clin Cancer Res.* 2002;8(1):217-20.

144. Lotan R, Ito H, Yasui W, Yokozaki H, Lotan D, Tahara E. Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. *Int J Cancer*. 1994;56(4):474-80.
145. Piantelli M, Iacobelli S, Almadori G, Iezzi M, Tinari N, Natoli C, et al. Lack of expression of galectin-3 is associated with a poor outcome in node-negative patients with laryngeal squamous-cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2002;20(18):3850-6.
146. Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer*. 1995;75(12):2818-26.
147. Plzak J, Betka J, Smetana K, Jr., Chovanec M, Kaltner H, Andre S, et al. Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004;40(15):2324-30.
148. Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz A. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer*. 1997;80(4):776-87.
149. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol*. 1995;147(3):815-22.
150. Lotz MM, Andrews CW, Jr., Korzelius CA, Lee EC, Steele GD, Jr., Clarke A, et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3466-70.
151. Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, et al. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol*. 1997;181(1):80-6.
152. Hubert M, Wang SY, Wang JL, Seve AP, Hubert J. Intranuclear distribution of galectin-3 in mouse 3T3 fibroblasts: comparative analyses by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Exp Cell Res*. 1995;220(2):397-406.
153. Purkrabkova T, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Holikova Z, Bock C, Lensch M, et al. New aspects of galectin functionality in nuclei of cultured bone marrow stromal and epidermal cells: biotinylated galectins as tool to detect specific binding sites. *Biol Cell*. 2003;95(8):535-45.

154. Friedman M, Shimaoka K, Getaz P. Needle aspiration of 310 thyroid lesions. *Acta Cytol.* 1979;23(3):194-203.
155. Montironi R, Braccischi A, Scarpelli M, Matera G, Alberti R. Value of quantitative nucleolar features in the preoperative cytological diagnosis of follicular neoplasias of the thyroid. *J Clin Pathol.* 1991;44(6):509-14.
156. Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology.* 2002;40(1):80-7.
157. Kurihara T, Ikeda S, Ishizaki Y, Fujimori M, Tokumoto N, Hirata Y, et al. Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid.* 2004;14(12):1020-9.
158. Harris H. *The Birth of the Cell.* New Haven: Yale University Press; 1999.
159. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. How cells read the genome: from DNA to protein. In: *Molecular biology of the cell.* 4a ed. New York: Garland Science; 2002. p. 299-374.
160. Spector DL. Nuclear domains. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 16):2891-3.
161. Dundr M, Misteli T. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.* 2001;356(Pt 2):297-310.
162. Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, et al. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(3):545-53.
163. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(17):3595-602.
164. Leung AK, Andersen JS, Mann M, Lamond AI. Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem J.* 2003;376(Pt 3):553-69.
165. Amero SA, Raychaudhuri G, Cass CL, van Venrooij WJ, Habets WJ, Krainer AR, et al. Independent deposition of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and small nuclear ribonucleoprotein particles at sites of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(18):8409-13.
166. Kennedy BK, Barbie DA, Classon M, Dyson N, Harlow E. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev.* 2000;14(22):2855-68.

167. Huang S. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol.* 2002;157(5):739-41.
168. Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J.* 1999;13(14):1911-22.
169. Eilbracht J, Reichenzeller M, Hergt M, Schnolzer M, Heid H, Stohr M, et al. NO66, a highly conserved dual location protein in the nucleolus and in a special type of synchronously replicating chromatin. *Mol Biol Cell.* 2004;15(4):1816-32.
170. Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev.* 2002;16(23):2991-3003.
171. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(4):1213-7.
172. Campos KN, Ximenes Netto M, Silva RO, Freitas LAM, Berger R, Vieira LF, et al. Taxas de crescimento como fator prognóstico no câncer de pulmão. *J Pneumol.* 1987;13(2):59-65.
173. Lin O, Olgac S, Green I, Zakowski MF, Klimstra DS. Immunohistochemical staining of cytologic smears with MIB-1 helps distinguish low-grade from high-grade neuroendocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(2):209-16.
174. Lin ZQ. Pathomorphological analysis of primary tumors of the trachea and bronchi of low malignancy: report of 52 cases [abstract]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Xi Ji Bing Za Zhi.* 1983;6(3):182-4.
175. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
176. Henry MJ, Stanley MW, Swenson B, Connolly JE, Bates H. Cytologic assessment of tumor cell kinetics: applications of monoclonal antibody Ki-67 to fine-needle aspiration smears. *Diagn Cytopathol.* 1991;7(6):591-6.
177. Okayasu I, Saegusa M, Fujiwara M, Hara Y, Rose NR. Enhanced cellular proliferative activity and cell death in chronic thyroiditis and thyroid papillary carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1995;121(12):746-52.
178. Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. *Br J Cancer.* 1997;75(4):537-41.
179. Baldus SE, Zirbes TK, Weingarten M, Fromm S, Glossmann J, Hanisch FG, et al. Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with

- histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. *Tumour Biol.* 2000;21(5):258-66.
180. Betka J, Plzak J, Smetana K, Jr., Gabius HJ. Galectin-3, an endogenous lectin, as a tool for monitoring cell differentiation in head and neck carcinomas with implications for lectin-glycan functionality. *Acta Otolaryngol.* 2003;123(2):261-3.
 181. Bergero N, De Pompa R, Sacerdote C, Gasparri G, Volante M, Bussolati G, et al. Galectin-3 expression in parathyroid carcinoma: immunohistochemical study of 26 cases. *Hum Pathol.* 2005;36(8):908-14.
 182. Chovanec M, Smetana K, Jr., Betka J, Plzak J, Brabec J, Moya-Alvarez V, et al. Correlation of expression of nuclear proteins pKi67 and p63 with lectin histochemical features in head and neck squamous cell cancer. *Int J Oncol.* 2005;27(2):409-15.
 183. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The cell cycle and programmed cell death. In: Molecular biology of the cell. 4a ed. New York: Garland Science; 2002. p. 983-1026.
 184. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chine S, Basolo F, Silvestri V, et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer.* 1998;34(5):718-23.
 185. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic bases of disease*. 4th ed. Boston: W B Saunders Company; 1989.
 186. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.* 1998;14(10):410-6.
 187. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281(5381):1322-6.
 188. Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 11):1743-53.
 189. Yang X, Yang S, Zhang J, Xue L, Hu Z. Role of Caspase 3 in neuronal apoptosis after acute brain injury. *Chin J Traumatol.* 2002;5(4):250-3.
 190. Yang SY, Xue L. Human neuronal apoptosis secondary to traumatic brain injury and the regulative role of apoptosis-related genes. *Chin J Traumatol.* 2004;7(3):159-64.

191. Ahmad M, Shi Y. TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells: potential for therapeutic intervention. *Oncogene*. 2000;19(30):3363-71.
192. Kasper M, Roehlecke C, Witt M, Fehrenbach H, Hofer A, Miyata T, et al. Induction of apoptosis by glyoxal in human embryonic lung epithelial cell line L132. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23(4):485-91.
193. Lee YJ, Song YK, Song JJ, Siervo-Sassi RR, Kim HR, Li L, et al. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Exp Cell Res*. 2003;288(1):21-34.
194. Yu F, Finley RL, Jr., Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15819-27.
195. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(1):4-6.
196. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
197. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(5):C947-70.
198. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *Embo J*. 2001;20(4):672-82.
199. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol*. 1988;133(2):419-23.
200. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(24):1875-87.
201. Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F. Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 1996;9(6):636-41.
202. Goldenberg JD, Portugal LG, Wenig BL, Ferrer K, Wu JC, Sabnani J. Well-differentiated thyroid carcinomas: p53 mutation status and microvessel density. *Head Neck*. 1998;20(2):152-8.

-
203. Dhar DK, Kubota H, Kotoh T, Tabara H, Watanabe R, Tachibana M, et al. Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg.* 1998;176(5):442-7.
204. Ishiwata T, Iino Y, Takei H, Oyama T, Morishita Y. Tumor angiogenesis as an independent prognostic indicator in human papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep.* 1998;5(6):1343-8.
205. O'Driscoll L, Linehan R, S MK, Cronin D, Purcell R, Glynn S, et al. Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNAs in breast cancer. *Cancer Lett.* 2003;201(2):225-36.
206. Jewett T. Color tutorial. RGB: red, green, and blue. *Department of Computer Engineering and Computer Science* [online]. 1997 [cited 2004 nov 6]. Available from: <http://www.cecs.csulb.edu/~jewett/colors/rgb.html>.
207. Agresti A. *Categorical data analysis*. New York: John Wiley & Sons; 1990.
208. Dawson B, Trapp R. *Basic and clinical biostatistics*. 2nda ed. Norwalk: Lange; 1994.
209. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 2nda ed. Massachusetts: PWS Publishers; 1986.
210. Stewart J. *Cálculo*. 4ªa ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning; 2002.
211. Shibata T, Noguchi T, Takeno S, Takahashi Y, Fumoto S, Kawahara K. Impact of nuclear galectin-3 expression on histological differentiation and vascular invasion in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2005;13(2):235-9.
212. Oka N, Takenaka Y, Raz A. Galectins and urological cancer. *J Cell Biochem.* 2004;91(1):118-24.
213. Miyazaki J, Hokari R, Kato S, Tsuzuki Y, Kawaguchi A, Nagao S, et al. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. *Oncol Rep.* 2002;9(6):1307-12.
214. Stillman BN, Mischel PS, Baum LG. New roles for galectins in brain tumors--from prognostic markers to therapeutic targets. *Brain Pathol.* 2005;15(2):124-32.
215. Medronho R, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. *Epidemiologia*. São Paulo: Atheneu; 2002.

-
216. Matei DV, Verweij F, Scardino E, Rocco B, Renne G, Tradati N, et al. Late solitary thyroid carcinoma metastasis to the kidney: a case report. *Anticancer Res.* 2003;23(1B):561-4.
217. Ahmadi MA, Nicholes D, Esmaeli B. Late choroidal metastasis secondary to papillary thyroid carcinoma. *Am J Ophthalmol.* 2001;132(5):796-8.
218. Mizukami Y, Nonomura A, Hayashi Y, Ohmura K, Michigishi T, Noguchi M, et al. Late bone metastasis from an encapsulated follicular carcinoma of the thyroid without capsular and vascular invasion. *Pathol Int.* 1996;46(6):457-61.
219. Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, et al. Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer.* 1985;55(4):794-804.
220. Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JCM, Ebina KN, et al. Marcadores biológicos de tumores tireoidianos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(1):114-25.
221. Fowles D, Colnot C, Ripoche MA, Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo. *Dev Dyn.* 1995;203(2):241-51.
222. Saada A, Reichert F, Rotshenker S. Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J Cell Biol.* 1996;133(1):159-67.
223. Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, et al. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem.* 2003;278(21):18938-44.
224. Califice S, Castronovo V, Van Den Brule F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol.* 2004;25(4):983-92.
225. Nucera C, Mazzon E, Caillou B, Violi MA, Moleti M, Priolo C, et al. Human galectin-3 immunoexpression in thyroid follicular adenomas with cell atypia. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(2):106-12.
226. De-Leon-Mazariegos R, Canedo-Patzi M, Perez-Enriquez B, Candanedo-Gonzalez F, Saqui-Salces M, Gamboa-Dominguez A, et al. Low galectin-3 capacity to discriminate thyroid lesions. *Rev Invest Clin.* 2004;56(5):623-8.

-
227. Cvejic D, Savin S, Petrovic I, Paunovic I, Tatic S, Krgovic K, et al. Galectin-3 expression in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Histopathology*. 2005;47(2):209-14.
228. Johansson AC, Visse E, Widegren B, Sjogren HO, Siesjo P. Computerized image analysis as a tool to quantify infiltrating leukocytes: a comparison between high- and low-magnification images. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(9):1073-79.
229. Kent MS, Griffey SM, Verstraete FJ, Naydan D, Madewell BR. Computer-assisted image analysis of neovascularization in thyroid neoplasms from dogs. *Am J Vet Res*. 2002;63(3):363-9.
230. Lind P, Igerc I, Kohlfurst S. Diagnosis, treatment and follow-up in the case of differentiated thyroid cancer. *Wien Med Wochenschr*. 2005;155(19-20):429-35.
231. Noguchi M, Yamada H, Ohta N, Ishida T, Tajiri K, Fujii H, et al. Regional lymph node metastases in well-differentiated thyroid carcinoma. *Int Surg*. 1987;72(2):100-3.
232. Uchino S, Noguchi S, Yamashita H, Watanabe S. Modified radical neck dissection for differentiated thyroid cancer: operative technique. *World J Surg*. 2004;28(12):1199-203.
233. Qubain SW, Nakano S, Baba M, Takao S, Aikou T. Distribution of lymph node micrometastasis in pN0 well-differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*. 2002;131(3):249-56.
234. Loprinzi CL. Follow-up testing for curatively treated cancer survivors. What to do? [editorial]. *Jama*. 1995;273(23):1877-8.
235. Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PP. Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3553-62.
236. Kukkonen ST, Haapiainen RK, Franssila KO, Sivula AH. Papillary thyroid carcinoma: the new, age-related TNM classification system in a retrospective analysis of 199 patients. *World J Surg*. 1990;14(6):837-41; discussion 841-2.
237. Salvesen H, Njolstad PR, Akslen LA, Albrektsen G, Soreide O, Varhaug JE. Papillary thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors including an evaluation of the p-TNM staging system. *Eur J Surg*. 1992;158(11-12):583-9.

-
238. Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med.* 1997;126(3):226-31.
239. Girelli ME, De Vido D. Serum thyroglobulin measurements in differentiated thyroid cancer. *Biomed Pharmacother.* 2000;54(6):330-3.
240. Spitz MR, Sider JG, Katz RL, Pollack ES, Newell GR. Ethnic patterns of thyroid cancer incidence in the United States, 1973-1981. *Int J Cancer.* 1988;42(4):549-53.
241. Lloyd RV. Distinguishing benign from malignant thyroid lesions: galectin 3 as the latest candidate. *Endocr Pathol.* 2001;12(3):255-7.
242. Irimura T, Matsushita Y, Sutton RC, Carralero D, Ohannesian DW, Cleary KR, et al. Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in human colorectal carcinoma progressed to metastatic stages. *Cancer Res.* 1991;51(1):387-93.
243. Hrdlickova-Cela E, Plzak J, Smetana K, Jr., Melkova Z, Kaltner H, Filipiec M, et al. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(11):1336-40.
244. Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, Zimmermann A, Korc M, et al. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Lab Invest.* 2000;80(8):1233-41.
245. Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol.* 1996;179(1):43-8.
246. Van den Brule FA, Waltregny D, Liu FT, Castronovo V. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer.* 2000;89(4):361-7.
247. Bassen R, Brichory F, Caulet-Maugendre S, Delaval P, Dazord L. Vertebrate galectins: structure and function, role in tumoral process. *Bull Cancer.* 2000;87(10):703-7.
248. Bartolazzi A, Bussolati G. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms [comment letter]. *Histopathology.* 2006;48(2):212-3.

249. Buchs AE, Zehavi S, Sher O, Yeheskely E, Muggia-Sulam M, Sherman Y, et al. Heparanase, galectin-3, and tissue factor mRNA are expressed in benign neoplasms of the thyroid. *Endocrine*. 2003;22(2):81-4.
250. Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R, Johnson SJ, Wilson JA, Davies BR, et al. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology*. 2004;45(5):493-500.
251. Mills LJ, Poller DN, Yiangou C. Galectin-3 is not useful in thyroid FNA. *Cytopathology*. 2005;16(3):132-8.
252. Saggiorato E, Cappia S, De Giuli P, Mussa A, Pancani G, Caraci P, et al. Galectin-3 as a presurgical immunocyodiagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(11):5152-8.
253. Oestreicher-Kedem Y, Halpern M, Roizman P, Hardy B, Sulkes J, Feinmesser R, et al. Diagnostic value of galectin-3 as a marker for malignancy in follicular patterned thyroid lesions. *Head Neck*. 2004;26(11):960-6.
254. MacDonald L, Yazdi HM. Nondiagnostic fine needle aspiration biopsy of the thyroid gland: a diagnostic dilemma. *Acta Cytol*. 1996;40(3):423-8.
255. Collet JF, Hurbain I, Prengel C, Utzmann O, Scetbon F, Bernaudin JF, et al. Galectin-3 immunodetection in follicular thyroid neoplasms: a prospective study on fine-needle aspiration samples. *Br J Cancer*. 2005;93(10):1175-81.
256. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 1998;58(14):3015-20.
257. Kovacs GL, Stelkovics E, Krenacs L, Gonda G, Goth M, Kovacs L, et al. Low level of cyclin D1 protein expression in thyroid microcarcinomas from an autopsy series. *Endocrine*. 2005;26(1):41-4.
258. Ito Y, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, et al. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid*. 2003;13(4):381-7.
259. Neder L, Marie SK, Carlotti CG, Jr., Gabbai AA, Rosemberg S, Malheiros SM, et al. Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol*. 2004;14(4):399-405.

-
260. Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Yong J, Shevchenko A, Mann M, et al. Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol.* 2000;148(6):1177-86.
261. Patterson RJ, Wang W, Wang JL. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9):499-506.
262. Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoche MA, Poirier F, Wang JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology.* 2002;12(5):329-37.
263. Sampson EM, Haque ZK, Ku MC, Tevosian SG, Albanese C, Pestell RG, et al. Negative regulation of the Wnt-beta-catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1. *Embo J.* 2001;20(16):4500-11.
264. Hrafnkelsson J, Stal O, Enestrom S, Jonasson JG, Bjornsson J, Olafsdottir K, et al. Cellular DNA pattern, S-phase frequency and survival in papillary thyroid cancer. *Acta Oncol.* 1988;27(4):329-33.
265. Kunzli BM, Berberat PO, Zhu ZW, Martignoni M, Kleeff J, Tempia-Caliera AA, et al. Influences of the lysosomal associated membrane proteins (Lamp-1, Lamp-2) and Mac-2 binding protein (Mac-2-BP) on the prognosis of pancreatic carcinoma. *Cancer.* 2002;94(1):228-39.
266. Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol.* 2000;2(5):E85-90.
267. Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J, et al. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(12):4635-40.
268. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 2004;64(18):6363-7.
269. Szoke T, Kayser K, Baumhake JD, Trojan I, Furak J, Tiszlavicz L, et al. Prognostic significance of endogenous adhesion/growth-regulatory lectins in lung cancer. *Oncology.* 2005;69(2):167-74.
270. Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. *Am J Pathol.* 2001;159(3):1055-60.

271. Gillenwater A, Xu XC, el-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 1996;18(5):422-32.
272. Teymoortash A, Pientka A, Schrader C, Tiemann M, Werner JA. Expression of galectin-3 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck and its relationship with distant metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132(1):51-6.
273. Cvejic DS, Savin SB, Petrovic IM, Paunovic IR, Tatic SB, Havelka MJ. Galectin-3 expression in papillary thyroid carcinoma: relation to histomorphologic growth pattern, lymph node metastasis, extrathyroid invasion, and tumor size. *Head Neck*. 2005;27(12):1049-55.
274. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H, Noguchi S. Immunostaining of galectin-3 and CD44v6 using fine-needle aspiration for distinguishing follicular carcinoma from adenoma. *Diagn Cytopathol*. 2004;31(6):392-6.
275. Dedivitis R, Guimarães AV. Carcinoma papilífero de tireóide localmente invasivo. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002;68(5):687-91.
276. Ulmer TA, Keeler V, Loh L, Chibbar R, Torlakovic E, Andre S, et al. Tumor-associated antigen 90K/Mac-2-binding protein: Possible role in colon cancer. *J Cell Biochem*. 2006.
277. William G, Stetler-Stevenson S, Kleiner DE. Molecular biology of cancer; invasion and metastasis. In: De Vita VT, Hellman S, Rosemberg SA. Cancer: principles and practice of oncology. 6a ed. Philadelphia: Lippcot, Williams & Wilkins; 2001. p. 123-25.
278. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 2005;10(2):267-75.
279. Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell*. 2004;15(8):3580-90.
280. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*. 2002;21(52):8001-10.
281. Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol*. 2004;24(10):4395-406.

282. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 2003;63(23):8302-11.
283. Mitsiades CS, Poulaki V, Mitsiades N. The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer. *J Endocrinol.* 2003;178(2):205-16.
284. Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Kuma K, Amino N. Decreased relative expression level of trefoil factor 3 mRNA to galectin-3 mRNA distinguishes thyroid follicular carcinoma from adenoma. *Cancer Lett.* 2005;219(1):91-6.
285. Ishigaki K, Namba H, Nakashima M, Nakayama T, Mitsutake N, Hayashi T, et al. Aberrant localization of beta-catenin correlates with overexpression of its target gene in human papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(7):3433-40.
286. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64(9):3037-45.
287. Choi J-H, Lim H-Y, Park JS, Lee H-W, Jung YM, Kim HC, et al. Expression of galectin-3 in non-small cell lung cancer (NSCLC): Prognostic significance in adenocarcinoma [abstract]. *Journal of Clinical Oncology, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings.* 2005;23(16S):961.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Quadro AP 1 – Classificação Histológica da Organização Mundial da Saúde de dos Tumores da Glândula Tireóide.

<p>1. Tumores Epiteliais:</p> <p>1.1. Benignos:</p> <p>1.1.1. Adenoma Folicular</p> <p>1.1.1.1. Características Arquiteturais</p> <p>1.1.1.1.1. Normofolicular (simples)</p> <p>1.1.1.1.2. Macrofolicular (colóide)</p> <p>1.1.1.1.3. Microfolicular (fetal)</p> <p>1.1.1.1.4. Trabecular e sólido (embrional)</p> <p>1.1.1.1.5. Atípico</p> <p>1.1.1.2. Características Citológicas</p> <p>1.1.1.2.1. Células oxifílicas</p> <p>1.1.1.2.2. Células claras</p> <p>1.1.1.2.3. Células produtoras de mucina</p> <p>1.1.1.2.4. Células em anel de sinete</p> <p>1.1.1.2.5. Células atípicas</p> <p>1.1.1.3. Outras Características</p> <p>1.1.2. Outros</p> <p>1.1.2.1. Tumores de glândulas salivares</p> <p>1.1.2.2. Adenolipomas</p> <p>1.1.2.3. Tumores trabeculares hialinizados</p> <p>1.2. Malignos:</p> <p>1.2.1. Carcinoma folicular</p> <p>1.2.1.1. Graus de Invasividade</p> <p>1.2.1.1.1. Minimamente invasivo (encapsulado)</p> <p>1.2.1.1.2. Amplamente invasivo</p> <p>1.2.1.2. Variantes</p> <p>1.2.1.2.1. Células oxifílicas (de Hürthle)</p> <p>1.2.1.2.2. Células claras</p> <p>1.2.2. Carcinoma papilífero</p> <p>1.2.2.1. Variantes</p> <p>1.2.2.1.1. Microcarcinoma papilífero</p> <p>1.2.2.1.2. Encapsulado</p> <p>1.2.2.1.3. Folicular</p> <p>1.2.2.1.4. Esclerose difusa</p> <p>1.2.2.1.5. Células oxifílicas (de Hürthle)</p>	<p>1.2.3. Carcinoma medular</p> <p>1.2.3.1. Variante</p> <p>1.2.3.1.1. Carcinoma misto medular-folicular</p> <p>1.2.4. Carcinoma indiferenciado (anaplásico)</p> <p>1.2.5. Outros Carcinomas</p> <p>1.2.5.1. Carcinoma mucinoso</p> <p>1.2.5.2. Carcinoma de células escamosas</p> <p>1.2.5.3. Carcinoma mucoepidermóide</p> <p>2. Tumores Não-epiteliais</p> <p>3. Linfomas malignos</p> <p>4. Miscelânea:</p> <p>4.1. Tumores das paratireóides</p> <p>4.2. Paragangliomas</p> <p>4.3. Tumor de células estreladas com cisto mucoso</p> <p>4.4. Teratomas</p> <p>5. Tumores secundários</p> <p>6. Tumores não-classificados</p> <p>7. Lesões “tumor-like”</p> <p>7.1. Bócio hiperplásico</p> <p>7.2. Cistos tireóideos</p> <p>7.3. Nódulos sólidos</p> <p>7.4. Tecido tireóideo ectópico</p> <p>7.5. Tireoidite crônica</p> <p>7.6. Tireoidite de Riedel</p> <p>7.7. Bócio amilóide</p>
---	--

FONTE: WHO *revised histologic classification of thyroid tumors*, 1999.

APÊNDICE B

Aprovação do Protocolo de Pesquisa 484/02 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) de 10 de julho de 2002.

APÊNDICE C: Protocolo empregado no levantamento dos prontuários

PROTOCOLO de CBDT: Estudo IHQ

DCCP – HC-FMUSP

1. IDENTIFICAÇÃO

Nº ANÁT. PATOL: _____

RGHC: _____

Fone: _____

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: ☐ F ☐ MCor: ☐ B ☐ P ☐ N ☐ A2. Q.C. Queixa e duração: ☐ Disfagia ☐ Disfonia ☐ Dispneia ☐ Tireóide ↑☐ Nódulo cervical () ☐ ↑ vol. cervic. ☐ Duração: _____A. Pessoais relevantes: ☐ Tabagista ☐ Etilista ☐ Outros: _____E.F.: ☐ Sem Bócio ☐ BU () ☐ BM () ☐ BD ☐ Linfonodo ↑ ()

3. EXAMES PRÉ-OPERATÓRIOS

PAAF: D = ☐ Papilífero ☐ Folicular ☐ Bócio ☐ Tireoidite ☐ Outros: __________/_____/____E = ☐ Papilífero ☐ Folicular ☐ Bócio ☐ Tireoidite ☐ Outros: _____Istmo = ☐ Papilífero ☐ Folicular ☐ Bócio ☐ Tireoidite ☐ Outros: _____DOSAGEM: T₃ = _____ T₄L = _____ TSH = _____ TGB = __________/_____/____ ☐ Anti-TPO ☐ Anti-TGB ☐ TRAB Uso T₄: _____ µg/dia

Uso PTU: _____ mg/dia

4. TRATAMENTO - Data da operação: ____/____/____

< lobectomia: ☐ D ☐ E ☐ Istmo ☐ Tireoidectomia totalLobectomia total: ☐ D ☐ E ☐ Istmo ☐ > TT _____Esvaziamento D: ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐ V ☐ VI ☐ VIIEsvaziamento E: ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐ V ☐ VI ☐ VII

PCI: ____/____/____ Captação 2h _____% Captação 24h _____%

Local: ☐ Leito tireóideo ☐ Cervical lateral ☐ hematogênica: _____RIT: ☐ Não realizada ☐ Realizada: ____/____/____ Dose = _____ mCi

5. EXAMES PÓS-OPERATÓRIOS

T₃ = _____ T₄L = _____ TSH = _____ TGB = _____ Anti-TGB = _____ Uso T₄: _____ µg/dia

_____/_____/____ Anti-TPO = _____

6. EVOLUÇÃO

Última consulta: ____/____/____

☐ Sem sinais de recidivaRecidiva: ____/____/____ ☐ Local (leito) ☐ Linfática ()☐ hematogênica: _____Diagnosticada por: ☐ Palpação☐ USG ☐ Tireoglobulina ☐ PAAFReoperação: ____/____/____ ☐ Local (leito) ☐ EsvaziamentoÓbito: ____/____/____ ☐ Causado pelo CBDT: _____

7. OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

8. CARACTERÍSTICAS U.S. (última antes da cirurgia) DATA: ____/____/____

Nódulo 1	Dimensão: ____x____x____mm
Localização:	☐ D ☐ E ☐ Istmo
	☐ 1/3 sup. ☐ 1/3 médio ☐ 1/3 inferior
Ecogenicidade:	☐ Hipoec. ☐ Hiperec. ☐ Isoec ☐ Anecóico ☐ Sólido
	☐ Misto ☐ Microcalc. ☐ Calcific. grosseiras
Limites:	☐ Irregular ☐ Halo periférico: _____
Circulação:	☐ Central ☐ Periférica ☐ Ausente ☐ não realizado doppler
Nódulo 2	Dimensão: ____x____x____mm
Localização:	☐ D ☐ E ☐ Istmo
	☐ 1/3 sup. ☐ 1/3 médio ☐ 1/3 inferior
Ecogenicidade:	☐ Hipoec. ☐ Hiperec. ☐ Isoec ☐ Anecóico ☐ Sólido
	☐ Misto ☐ Microcalc. ☐ Calcific. grosseiras
Limites:	☐ Irregular ☐ Halo periférico: _____
Circulação:	☐ Central ☐ Periférica ☐ Ausente ☐ não realizado doppler
Nódulo 3	Dimensão: ____x____x____mm
Localização:	☐ D ☐ E ☐ Istmo
	☐ 1/3 sup. ☐ 1/3 médio ☐ 1/3 inferior
Ecogenicidade:	☐ Hipoec. ☐ Hiperec. ☐ Isoec ☐ Anecóico ☐ Sólido
	☐ Misto ☐ Microcalc. ☐ Calcific. grosseiras
Limites:	☐ Irregular ☐ Halo periférico: _____
Circulação:	☐ Central ☐ Periférica ☐ Ausente ☐ não realizado doppler
Nódulo 4	Dimensão: ____x____x____mm
Localização:	☐ D ☐ E ☐ Istmo
	☐ 1/3 sup. ☐ 1/3 médio ☐ 1/3 inferior
Ecogenicidade:	☐ Hipoec. ☐ Hiperec. ☐ Isoec ☐ Anecóico ☐ Sólido
	☐ Misto ☐ Microcalc. ☐ Calcific. grosseiras
Limites:	☐ Irregular ☐ Halo periférico: _____
Circulação:	☐ Central ☐ Periférica ☐ Ausente ☐ não realizado doppler
Impressão final:	☐ Benigno ☐ Maligno ☐ Tireoidite

Observações:

9. ANATOMO-PATOLÓGICO - número: _____

Tipo Histológico:

- ☐ Folicular
- ☐ Papilífero:
 - ☐ Clássico
 - ☐ células altas
 - ☐ folicular
 - ☐ outros

Dimensões do carcinoma: _____ (mm)

Características associadas:

Extensão extratireóidea:	☐ SIM	☐ NÃO
Micro-invasão:	☐ SIM	☐ NÃO
Invasão vascular:	☐ SIM	☐ NÃO
Invasão perineural:	☐ SIM	☐ NÃO
Invasão linfática:	☐ SIM	☐ NÃO
Multicentricidade:	☐ SIM	☐ NÃO
Tireoidite:	☐ SIM	☐ NÃO
Bócio:	☐ SIM	☐ NÃO
Metástase linfática	☐ SIM	☐ NÃO
Metástase hematogênica	☐ SIM	☐ NÃO

10. CLASSIFICAÇÃO

TNM = _____

AMES = _____

APÊNDICE D

Tabela AP1 – Análise do tempo de sobrevivência global em 60 meses (Kaplan-Meier).

Tempo (meses)	Situação	Sobrevivência Acumulada	Erro Padrão	Eventos Acumulados	Número de Remanescentes
0	1			0	108
0	1			0	107
1	2	0,9907	0,0099	1	106
2	2	0,9813	0,0131	2	105
11	2			3	104
11	2	0,9626	0,0183	4	103
13	1			4	102
14	1			4	101
14	1			4	100
14	1			4	99
15	1			4	98
35	3			4	97
40	1			4	96
52	3			4	95
56	2	0,9525	0,0208	5	94
60	1			5	93
60	1			5	92
60	1			5	91
60	1			5	90
60	1			5	89
60	1			5	88
60	1			5	87
60	1			5	86
60	1			5	85
60	1			5	84
60	1			5	83
60	1			5	82
60	1			5	81
60	1			5	80
60	1			5	79
60	1			5	78
60	1			5	77
60	1			5	76
60	1			5	75
60	1			5	74
60	1			5	73
60	1			5	72
60	1			5	71
60	1			5	70
60	1			5	69
60	1			5	68
60	1			5	67
60	1			5	66
60	3			5	65
60	1			5	64
60	1			5	63
60	1			5	62
60	1			5	61
60	1			5	60
60	1			5	59
60	1			5	58
60	1			5	57
60	1			5	56
...	...			...	...
60	1	0,0000	0,0000	5	0

LEGENDA:

Situação: 1 = vivo; 2 = óbito relacionado; 3 = óbito não correlacionado.

APÊNDICE E

Tabela AP2 – Análise do tempo de sobrevivência livre de doença em 60 meses (Kaplan-Meier).

Tempo (meses)	Situação	Sobrevivência Acumulada	Erro Padrão	Eventos Acumulados	Número de Remanescentes
0	1			1	106
0	1			2	105
0	1	0,9720	0,0160	3	104
6	1	0,9626	0,0183	4	103
10	1			5	102
10	1			6	101
10	1	0,9346	0,0239	7	100
11	1	0,9252	0,0254	8	99
13	0			8	98
14	0			8	97
14	0			8	96
14	0			8	95
15	1	0,9155	0,0270	9	94
15	0			9	93
19	1	0,9057	0,0284	10	92
20	1			11	91
20	1	0,8860	0,0310	12	90
26	1	0,8761	0,0322	13	89
28	1	0,8663	0,0333	14	88
35	1	0,8564	0,0344	15	87
40	1	0,8466	0,0353	16	86
47	1	0,8367	0,0363	17	85
51	1			18	84
51	1	0,8171	0,0380	19	83
57	1			20	82
57	1	0,7974	0,0395	21	81
58	1	0,7875	0,0403	22	80
60	1	0,7777	0,0410	23	79
60	0			23	78
60	0			23	77
60	0			23	76
60	0			23	75
60	0			23	74
60	0			23	73
60	0			23	72
60	0			23	71
60	0			23	70
60	0			23	69
60	0			23	68
60	0			23	67
60	0			23	66
60	0			23	65
60	0			23	64
60	0			23	63
60	0			23	62
60	0			23	61
60	0			23	60
60	0			23	59
60	0			23	58
60	0			23	57
60	0			23	56
60	0			23	55
60	0			23	54
...	...			...	...
60	0			23	0

LEGENDA:

Situação: 1 = vivo sem doença; 2 = persistência ou recidiva; 3 = censurado.

APÊNDICE F

Stabenow E, Ab'Saber AM, Parra-Cuentas ER, Matos LL, Eher EM, Tavares MR, Capelozzi VL, Ferraz AR. Angiogenesis as an indicator of metastática potential in papillary thyroid carcinoma. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo.* 2005; 60(3):233-40.