ANA KOBER NOGUEIRA LEITE

**Análise clínica e molecular de fatores relacionados
ao óbito de pacientes com carcinoma diferenciado da
glândula tireoide**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências

Programa de Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr. Leandro Luongo de Matos

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Leite, Ana Kober Nogueira
Análise clínica e molecular de fatores
relacionados ao óbito de pacientes com carcinoma
diferenciado da glândula tireoide / Ana Kober
Nogueira Leite. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.
Orientador: Leandro Luongo de Matos.

Descritores: 1.Neoplasias da glândula tireoide
2.Metástase neoplásica 3.Causas de morte
4.Oncogenes

USP/FM/DBD-394/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

*À minha família, por me inspirarem a buscar a
excelência acadêmica.*

Ao Fabio, por estar sempre ao meu lado.

*Ao Antônio, por me fazer
querer ser uma pessoa melhor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de forma muito especial, ao meu orientador e amigo, Leandro. Sem seu apoio, orientação, ajuda e inspiração essa tese não existiria. Seu exemplo de excelência me estimula diariamente a buscar o melhor.

Agradeço a minha família, meus pais Marcelo e Claudia, minha irmã Paula e minha avó Leda por sempre me mostrarem, através de exemplo, a importância do conhecimento.

Ao meu marido Fabio, por sempre me apoiar em minhas decisões e estar ao meu lado. Principalmente, por compreender a importância das escolhas profissionais para mim e me apoiar incondicionalmente. A vida compartilhada com você é inestimavelmente melhor.

À Profa. Dra. Edna Teruko Kimura e a Kelly Cristina Saito do Instituto de Ciências Biomédicas da USP por abrirem as portas de seu laboratório para uma nova parceria. Apresentaram-me, com infinita paciência, ao mundo da biologia molecular e despertaram meu interesse na área.

À Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMUSP, aos colegas e ao Prof. Dr. Claudio Roberto Cernea por me acolher e apoiar na vida profissional.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Vamondes Kulcsar e aos colegas do ICESP por serem uma equipe de excelência da qual tenho o prazer de participar.

Ao ICESP como instituição, por ser um centro de referência internacional no tratamento do câncer que nos estimula a desenvolver pesquisa para o bem dos nossos pacientes.

À Disciplina de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP e do ICESP por seu excelente trabalho diário de analisar os tumores de nossos pacientes, o que permitiu esse estudo. Também, por me auxiliarem no processo de seleção dos blocos de parafina, e sua disponibilização, para análise molecular.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina do ABC, especialmente Thérèse Rachel Teodoro e Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal, por auxiliarem nos cortes de blocos de parafina.

Principalmente, aos pacientes, que são a razão pela qual fazemos tudo isso.

SUMÁRIO

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1. O CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE	8
3.1.1. INCIDÊNCIA	9
3.1.2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICO	12
3.1.3. TRATAMENTO E PROGNÓSTICO	18
3.1.4. MORTALIDADE	24
3.1.5. PATOGÊNESE	32
4. MÉTODOS	37
4.1. DELINEAMENTO	38
4.2. ÉTICA	38
4.3. CASUÍSTICA	38
4.4. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES GÊNICAS	41
4.4.1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO DE TECIDOS FIXADOS EM FORMALINA E EMBEBIDOS EM PARAFINA	41
4.4.2. AMPLIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS GENÔMICOS DOS GENES <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , <i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> E REGIÃO PROMOTORA DE <i>TERT</i> POR PCR	42
4.4.3. ANÁLISE DE MUTAÇÃO GÊNICA EM AMOSTRAS FFPE PELO MÉTODO DE SANGER	43
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5. RESULTADOS	46
5.1. FATORES PREDITIVOS DE MORTE EM PACIENTES COM METÁSTASES PULMONARES DE CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE	47
5.2. DADOS DESCRITIVOS DOS PACIENTES QUE MORRERAM DE CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE	52
5.3. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DOS GENES <i>BRAF</i> , <i>RAS</i> E <i>TERT</i>	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	75
8. ANEXOS	77
8.1. ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	78
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

/	Divisão, razão
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor
=	Igual a
X	Versus
ATA	Do inglês, <i>American Thyroid Association</i> (Associação Americana de Tireoide)
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i> (Comitê Unificado Americano sobre o Câncer)
<i>BRAF</i>	Gene <i>BRAF</i>
BRAF	Proteína BRAF
CDT	Carcinoma diferenciado da tireoide
CFT	Carcinoma folicular
CPT	Carcinoma papilífero
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido deoxiribonucleico)
DP	Desvio padrão
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EET	Extensão extra-tireoideana

<i>et al.</i>	e colaboradores
FFPE	Do inglês, <i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i> (fixado em formol e embutido em parafina)
g	<i>Gravidade</i>
HR	Do inglês, <i>Hazard ratio</i>
HRAS	Gene, do inglês <i>Harvey Rat Sarcoma</i>
I ¹³¹	Isótopo radioativado do iodo
IC	Intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KRAS	Gene, do inglês <i>Kirsten Rat Sarcoma</i>
LND	Linfonodo
MACIS	do inglês <i>Metastasis, Age, Completeness of resection, Invasion, Size of the tumor</i> (Metástase, Idade, Ressecção completa da lesão, Invasão, Tamanho do tumor) - Sistema MACIS de Estadiamento de Carcinoma Papilífero da Tireoide
MAPK	Do inglês, <i>Mitogen activated protein kinase</i>
mM	Milimolar
mU/L	<i>Miliunidades por litro</i>
n	<i>Número</i>

NCDB	Do inglês, <i>National Cancer Database</i> (base de dados nacional do câncer)
ng/mL	Nanograma por mililitro
NRAS	Gene, do inglês <i>Neuroblastoma Rat Sarcoma</i>
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância de resultado estatístico
p53	Proteína p53
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
pb	Pares de base
PCI	Pesquisa de corpo inteiro
PCR	Do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PET	Do inglês, <i>positrons emission tomography</i> (tomografia por emissão de pósitrons)
<i>PPAR-γ</i>	Gene <i>PPAR-γ</i>
RAF	Do inglês, <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	Família de gene, do inglês <i>Rat Sarcoma</i>
<i>RET/PTC</i>	Gene <i>RET/PTC</i>
SDS	Do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfat</i> (dodecil sulfato de sódio)
SEER	Do inglês, <i>Surveillance, Epidemiology, and End-Results</i> (vigilância, epidemiologia e resultados finais)

SOE	Sem origem específica
SPSS	Do inglês, <i>Statistical Package for Social Science</i>
T4	Tiroxina
TA	Temperatura de anelamento
TCGA	Do inglês, <i>Cancer Genome Atlas Study</i> (<i>estudo do Genoma humano</i>)
TE	Tempo de extensão
TERT	Do inglês, <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i> (transcriptase reversa da telomerase)
TG	Tireoglobulina
TNM	do inglês <i>Tumour, Node, Metastasis</i> (Tumor, Linfonodo, Metástase) - Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos
Tris-HCl	Solução hidroximetilaminometano-ácido clorídrico
TSH	do inglês <i>thyroid-stimulating hormone</i> (hormônio estimulador da tireoide)
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo
WT	Do inglês, <i>wild type</i> (fenótipo selvagem)
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores clínicos e demográficos associados à malignidade na avaliação do nódulo tireoidiano.	13
Tabela 2. Características ultrassonográficas, risco de malignidade e indicações de punção aspirativa por agulha fina em nódulos tireoidianos.	14
Tabela 3. O Sistema de Classificação de Bethesda para o diagnóstico citológico do nódulo tireoidiano: categorias diagnósticas recomendadas	15
Tabela 4. O Sistema de Classificação de Bethesda para o diagnóstico citológico do nódulo tireoidiano: risco atribuído de malignidade e proposta de conduta.	16
Tabela 5. Comparação das características de performance dos testes moleculares disponíveis para avaliação de nódulos da tireoide.	17
Tabela 6. Classificação do tumor (T), metástases linfonodais (N) e metástases a distância (M) de acordo com a AJCC (8ª edição).	20
Tabela 7. Estadiamento do carcinomas diferenciados da tireoide de acordo com a AJCC (8ª edição).	21
Tabela 8. Estratificação de risco de acordo com a ATA.	22
Tabela 9. Estudos de sobrevivência em carcinoma diferenciado da tireoide.	26
Tabela 10. Fatores prognósticos associados a menor sobrevivência em carcinoma diferenciado da tireoide.	28
Tabela 11. Sequência de <i>primers</i> utilizados para amplificação dos genes de interesse por <i>nested-PCR</i>	43
Tabela 12. Dados descritivos dos pacientes com metástases pulmonares de carcinoma diferenciado da tireoide.	48
Tabela 13. Análise univariada dos fatores associados com morte em pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide e metástases pulmonares.	49
Tabela 14. Análise multivariada dos fatores preditivos de morte em pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide e metástases pulmonares.	50
Tabela 15. Características clínicas dos cinco casos de pacientes com CDT com desdiferenciação na sua evolução.	51
Tabela 16. Análise multivariada dos fatores preditivos de morte em pacientes com carcinoma papilífero da tireoide e metástases pulmonares.	52
Tabela 17. Dados descritivos dos pacientes que morreram por carcinoma diferenciado da tireoide no ICESP de janeiro 2009 a dezembro de 2016 (n=33).	53
Tabela 18. Dados descritivos das análises das mutações <i>BRAF^{v600E}</i> , <i>RAS</i> e <i>TERT</i> encontradas no grupo de pacientes com CDT que morreram por progressão de doença.	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem representativa do eletroferograma do gene *BRAF* contendo o *hotspot* T1799A (destaque em amarelo) obtida do sequenciamento pelo método de Sanger. A. sequência selvagem. B. sequência mutada. 44
- Figura 2.** Curvas de Kaplan-Meier demonstrando menor sobrevivência específica entre os pacientes com CDT e metástases pulmonares que apresentaram desdiferenciação tumoral durante o seguimento (20,0% vs. 46,1%; $p=0,003$ - teste de log-rank). 51
- Figura 3.** Imagens tomográficas de tórax (A) e abdome (B) de paciente com carcinoma folicular de tireoide pT1a de 5 mm que morreu por obstrução de brônquio fonte esquerdo devido a compressão metastática. 55
- Figura 4.** Curvas de Kaplan-Meyer demonstrando a sobrevivência acumulada entre o diagnóstico e a doença metastática (A), entre o diagnóstico e a progressão de doença (B), entre o diagnóstico e a morte (C) e entre o diagnóstico da metástase e a morte (D) na evolução dos pacientes que morreram por carcinoma diferenciado da tireoide. 56
- Figura 5.** Curva de Kaplan-Meyer demonstrando a sobrevivência acumulada entre a progressão de doença e o óbito. 57

RESUMO

Leite AKN. *Análise clínica e molecular de fatores relacionados ao óbito de pacientes com carcinoma diferenciado da glândula tireoide* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: O carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) é de comportamento indolente e mortalidade menor do que 5% em 10 anos, com propostas cada vez menos agressivas de tratamento. No entanto, fatores confiáveis para diferenciar pacientes com pior prognóstico e maior risco de mortalidade são pouco conhecidos e as análises moleculares possuem grande potencial nesse âmbito. Recentemente, relatos sugerem maior agressividade em casos de associações das mutações *BRAF*, *RAS* e *TERT*. **MÉTODOS:** Estudo retrospectivo com análise de prontuários dos pacientes com CDT (carcinoma papilífero e folicular) tratados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo entre 2009 e 2015. Inicialmente, foram selecionados pacientes metastáticos para o pulmão para análise de fatores relacionados a mortalidade seguida da avaliação descritiva de pacientes que morreram por CDT. Entre os pacientes que morreram por CDT, foi realizada análise dos genes *BRAF*, *RAS* e *TERT* a partir de material parafinado. **RESULTADOS:** Foram identificados 54 pacientes com metástases pulmonares de CDT. Os fatores de risco independentes relacionados ao óbito nesses pacientes foram o sexo masculino (HR=4,2, p=0,042), idade acima de 45 anos (HR=10,9; p=0,038) e a desdiferenciação tumoral (HR=31,6; p<0,001). Entre os 33 pacientes que morreram por CDT (22 carcinomas papilíferos e 10 carcinomas foliculares), 94% tinham acima de 45 anos, 63,6% eram do sexo feminino e a maioria tinham tumores avançados (76,8% T3 e T4, 7,7% T2 e 15,4% T1). Todos exceto um paciente tinham metástase a distância e a principal causa de morte foi a progressão de doença metastática pulmonar (51,5%). A maioria dos pacientes morreu da progressão de doença metastática ou complicações diretamente relacionadas ao seu tratamento (85,3%). O tempo médio entre o diagnóstico e a morte foi de 71,4 meses e a mediana de sobrevivência entre a progressão de doença e a morte foi de 22 meses. Foram analisadas 15 amostras de tumores primários parafinados, sendo dez carcinomas papilíferos, um carcinoma diferenciado sem origem específica e quatro carcinomas foliculares. Três casos de carcinoma papilífero apresentaram mutação do *BRAF*, nenhum caso de carcinoma folicular apresentou mutação *RAS* e três de dez apresentaram mutação do *TERT* (2 carcinomas papilíferos e 1 folicular). Apenas um caso teve a associação *BRAF* e *TERT* mutados. **CONCLUSÕES:** Entre os pacientes com metástases pulmonares atenção especial deve ser dada aos casos do sexo masculino, idade acima de 45 e que apresentam desdiferenciação tumoral na evolução pelo maior risco de morte. A principal causa de morte entre os pacientes com CDT é relacionada às metástases a distância, principalmente pulmonares. A partir do momento em que está definida a progressão de doença, a evolução para o óbito é rápida, com mediana de sobrevivência de apenas 22 meses. A prevalência relativamente alta de *TERT* mutado nessa amostra está de acordo com dados da literatura e favorece a ideia de que essa mutação está potencialmente associada a maior agressividade do CDT.

Descritores: Neoplasias da glândula tireoide; Metástase neoplásica; Causas de morte; Oncogenes.

SUMMARY

Leite AKN. *Clinical and molecular analysis of factors related to death in patients with differentiated thyroid carcinoma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

INTRODUCTION: Differentiated thyroid carcinoma (DTC) is an indolent disease with mortality below 5% in 10 years and this is causing a global tendency to treat these patients less aggressively. However, there are no reliable tools to differentiate the patients that will have a worst outcome, but great research is being done in the molecular field. Recently, studies have demonstrated the associations of *BRAF*, *RAS* and *TERT* mutations in more aggressive cases. **METHODS:** Retrospective study with medical records analyses of patients treated for DTC at a single institution (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo) from 2009 to 2015. Initially, patients with lung metastasis were included to study factors related to mortality, followed by descriptive analyses of all patients that died from DTC. Amongst these, paraffin embedded tumor specimens were selected to study *BRAF*, *RAS* and *TERT* mutations. **RESULTS:** Fifty-four patients with lung metastasis were identified. Independent risk factors for death in these patients were male sex (HR=4.2; P=0.042), age older than 45 years (HR=10.9 P=0.038) and tumor dedifferentiation (HR=31.6; P<0.001). Amongst the 33 patients that died from DTC, 94% were older than 45 years, 63,6% were female and the majority had advanced tumors (76.8% T3 and T4, 7.7% T2 and 15.4% T1). All but one patient had distant metastasis and the main cause of death was respiratory failure due to disease progression of lung metastasis (51.5%). The majority of deaths were related to distant metastasis or direct complications from their treatment (85.3%). The mean time between diagnosis and death was 71.4 months and the median survival between disease progression and death was reached at 22 months. Fifteen tumor samples were analyzed, ten papillary thyroid carcinomas, one differentiated thyroid cancer without specification and four follicular carcinomas. Three papillary carcinomas had *BRAF* mutations, no follicular carcinomas had *RAS* mutations and three from ten patients had *TERT* mutations (two papillary and one follicular carcinoma). Only one case had the association of both *BRAF* and *TERT* mutations. **CONCLUSIONS:** Amongst the patients with lung metastasis, special attention should be given to those of the male gender, older than 45 years and with tumor dedifferentiation because of the higher mortality risk. The main cause of death amongst DTC patients is related to distant metastasis, specially lung metastasis and once there is disease progression the median survival is only 22 months. The higher *TERT* mutation prevalence amongst these patients agrees with data that shows the association with this mutations and more aggressive behavior of DTC.

Descriptors: Thyroid neoplasms; Neoplasm metastasis; Cause of death; Oncogenes

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer da tireoide é a neoplasia endócrina mais frequente, e o quinto câncer mais comumente diagnosticado em mulheres. Nos Estados Unidos, estima-se que em 2019 serão diagnosticados aproximadamente 52.070 novos casos, sendo 37.810 em mulheres; com uma proporção de 3:1. A estimativa é de que ocorreram 2.170 mortes pela doença em 2017 no país, com uma mortalidade de 0,4%¹.

No Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019, 1.570 novos casos por ano de câncer da tireoide em homens e 8.040 em mulheres, sendo também o quinto câncer mais comum entre as mulheres².

A maioria dos carcinomas da glândula tireoide são originados das células foliculares³. Cerca de 95% deles são carcinomas papilíferos ou carcinomas foliculares, classificados como carcinomas diferenciados da tireoide (CDT) e tem um excelente prognóstico a longo prazo^{3, 4}. Os demais compreendem variantes mais agressivas como o carcinoma pouco diferenciado e o carcinoma anaplásico (respectivamente, menos de 1% e 2% dos casos). Cerca dos 3% restante são representados pelo carcinoma medular, que tem origem nas células para-foliculares da tireoide e frequentemente são relacionados às neoplasias endócrinas múltiplas e à herança genética⁴.

A incidência do câncer de tireoide vem aumentando significativamente. Nos Estados Unidos, em 1990, houve uma incidência de oito casos por 100

mil habitantes e, em 2013, esse número foi de 22,6 casos por 100 mil habitantes⁵. Tal aumento pode ser explicado, em grande parte, pela difusão do uso de métodos diagnósticos mais precisos como ultrassonografia e punção aspirativa por agulha fina (PAAF) em pacientes assintomáticos⁶. No entanto, estudos demonstram que há um aumento real na incidência em alguns países, com aumento, inclusive, do número de casos de CDT avançados, e esse dado ainda não é totalmente compreendido⁷.

As taxas de metástases a distância são bastante variáveis, ocorrendo em 1% a 28% dos CDT. O sítio mais frequentemente acometido é o pulmão, seguido pelo osso⁸⁻¹¹ e são mais frequentes no carcinoma folicular. A presença de metástases a distância é associada com pior prognóstico em comparação com a doença localizada, entretanto, a sobrevivência é alta (60% a 85% em 10 anos) comparada com doença disseminada originária de outros órgãos^{10, 12}. Embora tenham curso lento na maioria dos casos, sua progressão é a principal causa de óbito por CDT^{13, 14}. Esse grupo é heterogêneo e ainda não totalmente compreendido, com casos com rápida progressão e óbito e alguns até com regressão completa após radioiodoterapia¹⁵.

Como demonstrado, o carcinoma diferenciado da tireoide tem comportamento indolente e, na maioria dos casos, ótimo prognóstico com mortalidade baixa, mesmo nos casos metastáticos. Dados da literatura revelam que menos de 5% dos pacientes com CDT morrem da doença em dez anos¹⁶⁻¹⁸. Baseado nessa noção de comportamento indolente e aumento da incidência, existe uma necessidade de se determinar os fatores que são relacionados a maior agressividade em pacientes com CDT, afim de se identificar os casos que poderiam ser seguramente tratados de forma

conservadora e quais necessitariam de um tratamento mais agressivo. O perfil demográfico desses pacientes e as características clínicas entre os grupos, além da análise molecular, podem auxiliar na distinção entre os casos de comportamento biológico distinto.

Neste estudo buscou-se avaliar os fatores clínicos relacionados ao óbito por CDT e a possível influência de mutações nos genes *BRAF*, *RAS* e *TERT* nesse desfecho.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Analisar os fatores de risco relacionados ao óbito nos pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide metastáticos para o pulmão;
- Avaliar o perfil demográfico, clínico, histopatológico e causa de morte dos pacientes que morreram por carcinoma diferenciado da tireoide;
- Avaliar a presença das mutações *BRAF*, *RAS* e *TERT* nos pacientes que morreram por carcinoma diferenciado da tireoide

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE

O carcinoma diferenciado da tireoide origina-se das células foliculares da glândula e é a forma mais frequente de câncer da tireoide, responsável por mais de 90% dos casos. Os tipos histológicos compreendidos nessa categoria são o carcinoma papilífero e o carcinoma folicular.

O carcinoma papilífero (CPT) é o câncer mais comum da tireoide, diagnosticado em 80% dos casos. Apresenta-se inicialmente como um nódulo tireoideano e a sua forma de disseminação mais comum é a metástase linfonodal, que pode estar clinicamente presente em até um terço dos pacientes¹⁹, e micrometástases em até 80%²⁰. Muitas vezes é diagnosticado através de exames de imagem realizados rotineiramente, principalmente pela ultrassonografia. Seu comportamento é normalmente indolente, com progressão lenta e baixíssima mortalidade (aproximadamente 0,5%)¹⁶⁻¹⁸. Metástases a distância podem ocorrer em 1% a 8%, e o pulmão é o sítio mais comum⁸⁻¹⁰.

Suas principais características histológicas são a formação de papilas, núcleos com pseudoinclusões e fendas e presença de corpos psamomatosos. Existem diversas variantes do carcinoma papilífero, sendo as principais a variante clássica, folicular, células altas e esclerosante difusa. Algumas

variantes apresentam comportamento mais agressivo como a variante células altas, células colunares e esclerosante difusa²¹.

O carcinoma folicular de tireoide (CFT) é a neoplasia maligna advinda da proliferação de células foliculares que não apresentam características nucleares do carcinoma papilífero, mas sim invasão de vasos e/ou da cápsula do nódulo. Sua evolução também é indolente, mas apresenta como diferencial o fato de sua principal forma de disseminação ser hematogênica e não linfática, gerando um número alto de metástases a distância, 7-28%^{11, 22, 23}. Também geralmente se apresenta como nódulo na glândula, mas existem casos em que o diagnóstico é feito a partir da apresentação da metástase a distância ²⁴.

3.1.1. INCIDÊNCIA

O CDT apresenta-se em indivíduos de todas as faixas etárias, porém com maior incidência entre os 30 e 50 anos, sendo mais frequente nas mulheres (razão mulher:homem de aproximadamente 4:1)²⁵. É, ainda, o quinto câncer mais frequente em mulheres ².

Nos Estados Unidos da América, estima-se que em 2019 sejam diagnosticados 52.070 novos casos, desses, 37.810 em pacientes do sexo feminino. A estimativa de mortalidade é de 2.170 casos¹.

No Brasil, os dados epidemiológicos referentes ao câncer da tireoide são deficientes, mas estima-se que em 2018 foram diagnosticados 1.570 casos em homens e 8.040 casos em mulheres, sendo o quinto câncer mais comum no sexo feminino². O Instituto Nacional do Câncer (INCA) incluiu o

câncer de tireoide na sua estimativa epidemiológica pela primeira vez apenas no ano de 2012.

Coeli *et al.*²⁶ em 2005 estudaram a mortalidade e a incidência do câncer de tireoide no Brasil desde o ano de 1980 em sete grandes cidades brasileiras: São Paulo, Porto Alegre, Recife, Belém, Goiânia, Distrito Federal e Salvador. Foi observada uma grande variação das taxas de incidência entre os locais estudados, especialmente para o sexo feminino. Nos homens, as taxas ajustadas variaram de 0,7 casos por 100 mil habitantes em Belém até 3,0 casos novos por 100 mil habitantes em São Paulo. Belém e São Paulo também foram as cidades que apresentaram, respectivamente, a menor (0,8 casos por 100 mil habitantes) e a maior taxa ajustada no sexo feminino (10,9 casos por 100 mil habitantes). A taxa de mortalidade ajustada foi de 0,22 casos por 100 mil habitantes entre 1995 e 1999, sendo identificado um declínio de 21% em relação à taxa de 0,28 casos por 100 mil habitantes observada entre 1980 e 1984 para o sexo masculino. Já para o sexo feminino, o valor da taxa no último quinquênio foi de 0,42 casos por 100 mil habitantes, sendo também observado um declínio de 17% em relação à taxa ajustada de 0,51 casos por 100 mil habitantes observada no primeiro quinquênio (1980-1984).

A incidência do câncer de tireoide vem aumentando significativamente, principalmente devido ao aumento no diagnóstico dos carcinomas papilíferos da tireoide, com uma pequena contribuição no aumento da incidência dos carcinomas foliculares²⁷. Dados americanos mostram que em 1990 houve uma incidência de 8/100.000 habitantes, e em 2013 esse número foi de 22,6/100.000 habitantes⁵.

Tal aumento pode ser explicado, em grande parte, pela difusão do uso de métodos diagnósticos mais precisos como ultrassonografia e punção aspirativa por agulha fina (PAAF) em pacientes assintomáticos⁶. Fato que apoia essa teoria é que, segundo dados coletados da base de dados americana do SEER (do inglês *Surveillance, Epidemiology and End Results*), o aumento mais acentuado da incidência foi nos carcinomas menores que 2 cm, em que a incidência aumentou quase cinco vezes entre 1983 e 2011 (de 2 a 9,6 por 100.000 habitantes). Enquanto tumores entre 2 e 5 cm tiveram duplicada a incidência (1,4 a 3,7 por 100.000 habitantes), tumores acima de 5 cm, que são mais raros, triplicaram (0,2 a 0,7 por 100.000 habitantes)²⁷.

No entanto, há estudos que demonstram um aumento real na incidência em alguns países, com incremento de carcinomas diferenciados da tireoide avançados, e esse dado ainda não é totalmente compreendido. Lim *et al.*⁷ demonstraram, também com base nos dados do SEER, que houve um aumento na mortalidade global por câncer de tireoide entre 1994 e 2013 de 1,1% ao ano, e de 2,3% ao ano nos casos de carcinomas papilíferos avançados. Associam a isso o aumento na incidência de carcinomas avançados de 3,5% ao ano desde 1981. Com isso, defendem uma elevação real na incidência dos cânceres de tireoide, não só nos casos iniciais com aumento devido a busca ativa através de exames de imagem. O motivo para tal aumento na incidência não é totalmente compreendido, mas são aventadas hipóteses relacionados a fatores de risco atuais como a obesidade²⁸.

Portanto, não há consenso na literatura referente à causa do aumento da incidência, mas a impressão geral é que há tanto um aumento devido ao “superdiagnóstico” quanto um aumento real devido ao aumento de casos

avançados. Também há relatos de um aumento mais acentuado na incidência no sexo feminino em relação ao sexo masculino²⁹ e pacientes acima de 45 anos³⁰, também por mecanismos ainda não elucidados.

3.1.2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICO

Os carcinomas da tireoide se apresentam inicialmente como nódulos tireoidianos. A presença de nódulos tireoidianos na palpação cervical é algo relativamente comum, podendo ser identificada em até 10% das mulheres e 2% dos homens. Quando a ultrassonografia é utilizada, podem-se diagnosticar nódulos em até 50% das pessoas^{31, 32}.

É importante fazer uma avaliação clínica completa, com atenção para o gênero (pacientes do sexo masculino têm maior risco de malignidade) e idade. Nódulos tireoidianos em pacientes abaixo de 16 anos ou acima de 45 anos também têm um maior risco de câncer³³.

Antecedentes pessoais de contato com radiação ou história familiar de câncer da tireoide devem ser pesquisados. Sintomas como dispneia ou disfagia sugerem compressão ou invasão local. A presença de disfonia deve ser avaliada, pela forte sugestão de invasão do nervo laríngeo inferior³¹.

Os principais fatores relacionados ao aumento do risco de malignidade nos nódulos tireoidianos estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores clínicos e demográficos associados à malignidade na avaliação do nódulo tireoidiano.

FATOR AVALIADO	RISCO DE MALIGNIDADE
Sexo ³⁴	Sexo masculino: duas a três vezes mais risco.
Idade ³⁵	- Menos de 20 anos: dobra o risco; - Acima de 45 anos: aumenta o risco; - Acima de 70 anos: quatro vezes mais risco.
Radiação ionizante ^{34, 36}	- Período de latência é habitualmente de 10 a 15 anos e geralmente ocorre após 20 a 30 anos da exposição; - Há um aumento de 40% no risco absoluto de malignidade; - Baixas doses: 100 vezes mais risco; - Altas doses: até 300 vezes mais risco.
História familiar ^{37, 38}	- Maior risco de desenvolver CDT se parente de primeiro grau acometido.
Tamanho do nódulo ^{35, 39, 40}	- Quanto maior o nódulo, especialmente os superiores a 4 cm, ou a presença de sintomas obstrutivos, maior o risco de malignidade.
Taxa de crescimento ^{36, 39}	- Histórico de crescimento rápido, especialmente em semanas, indica um maior risco de malignidade.
Paralisia de prega vocal ³⁹	- Presença de disfonia e paralisia de prega vocal por envolvimento do nervo laríngeo inferior é critério de alta probabilidade de malignidade.
Linfonodos cervicais ³⁹	- Alto risco de malignidade.
Características clínicas do nódulo ^{39, 41}	- Nódulos endurecidos ou fixos a planos profundos, indicam maior risco de malignidade; - Nódulos fibroelásticos, móveis à deglutição ou de aspecto cístico, denotam baixo risco de malignidade.

Nota: Adaptado de Eng *et al.* 2010³¹.

A dosagem sérica de tireoglobulina na investigação de nódulos tireoidianos não é recomendada. Muitas doenças da tireoide, e até mesmo o aumento glandular, cursam com aumento da tireoglobulina e tal dado não é significativo no diagnóstico⁴².

O diagnóstico do câncer de tireoide é feito principalmente baseado na ultrassonografia com doppler colorido, seguido da PAAF guiada por ultrassonografia, sempre que possível e quando necessário.

A ultrassonografia cervical com doppler colorido deve ser sempre realizada para avaliação de nódulos tireoidianos. Tem como objetivo avaliar se há de fato um nódulo conforme suspeita clínica, o tamanho do nódulo, as características ultrassonográficas do nódulo e a presença de linfonodos

suspeitos^{42, 43}.

Os principais achados ultrassonográficos dos nódulos tireoidianos, seus riscos de malignidade e indicação de PAAF estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Características ultrassonográficas, risco de malignidade e indicações de punção aspirativa por agulha fina em nódulos tireoidianos.

Padrão Ultrassonográfico	Características ultrassonográficas	Risco estimado de malignidade	Recomendação de PAAF
Altamente suspeito	Nódulo sólido hipoecogênico ou nódulo parcialmente cístico com componente sólido e hipoecogênico com uma ou mais características a seguir: limites imprecisos, microcalcificações, forma mais alta do que larga, calcificações periféricas interrompidas com extrusão de tecidos moles, sinais de extensão extra tireoidiana (EET).	70-90%	≥ 1 cm
Suspeita intermediária	Nódulo sólido, hipoecogênico, com margens bem delimitadas, sem microcalcificações, EET ou forma mais alta do que larga.	10-20%	≥ 1 cm
Baixa suspeita	Nódulo isoecogênico ou hiperecogênico, ou parcialmente cístico com áreas sólidas sem microcalcificações, forma mais alta do que larga ou EET.	5-10%	> 1,5 cm
Muito baixa suspeita	Nódulos espongiformes ou parcialmente císticos sem nenhuma característica descrita nos grupos de suspeita alta, intermediária ou baixa.	< 3%	Considerar acima de 2 cm ou observação
Benigno	Puramente cístico sem componente sólido.	< 1%	Não indicada

Nota: Adaptado de Haugen *et al.* 2016⁴².

O padrão de vascularização do nódulo também é um fator descrito como relacionado a malignidade. Quanto mais central o padrão de vascularização do nódulo ao invés de periférico, maior o risco de malignidade⁴⁴. Tal achado deve ser levado em conta em conjunto com as características suspeitas restantes para a decisão de prosseguir ou não com

a investigação.

Desde 2009, os resultados citológicos são reportados de acordo com a Classificação de Bethesda, que foi proposta para padronizar os resultados de PAAF de nódulos tireoidianos. Nela existem seis categorias com características citológicas distintas, e estimativas de risco de malignidade crescente⁴⁵. A adoção de tal classificação é fortemente recomendada no consenso da *American Thyroid Association* (ATA) de 2015 como forma de comunicar os resultados de PAAF tireoidianas⁴². Tal classificação foi atualizada em 2017, mas as seis categoriais iniciais foram mantidas⁴⁶. Os possíveis diagnósticos, as porcentagens de distribuição e a característica citológica de cada categoria são descritos na Tabela 3.

Tabela 3. O Sistema de Classificação de Bethesda para o diagnóstico citológico do nódulo tireoidiano: categorias diagnósticas recomendadas

CATEGORIA
I. Não diagnóstica ou insatisfatória
- Espécimes de cistos tireoidianos, fluidos acelulares, artefatos de fixação ou presença de sangue;
II. Benigno
- Compatível com: nódulo folicular benigno (incluindo nódulos adenomatosos, nódulos coloides etc.), tireoidite linfocítica (de Hashimoto) ou tireoidite granulomatosa (subaguda);
III. Atipia ou lesão folicular de significado indeterminado
IV. Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular
- Inclui as variantes oncocíticas (células de Hurthle);
V. Suspeito de malignidade
- Suspeito para carcinoma papilífero, folicular ou medular, linfoma ou outros;
VI. Maligno
- Inclui os carcinomas papilífero, pouco diferenciado, medular, anaplásico ou espinocelular da tireoide, carcinomas metastáticos, linfomas ou outros;

Nota: Adaptado de Cibas *et al.* 2017^{45, 46}

O risco de malignidade e a conduta sugerida para cada categoria está resumida na Tabela 4.

Tabela 4. O Sistema de Classificação de Bethesda para o diagnóstico citológico do nódulo tireoidiano: risco atribuído de malignidade e proposta de conduta.

CATEGORIA DIAGNÓSTICA		Risco de Malignidade	Conduta sugerida
I.	Amostra não diagnóstica ou insatisfatória	5 - 10%%	Repetir a PAAF guiada por ultrassonografia
II.	Benigno	0 – 3%	Seguimento clínico quando não houver outra indicação de tireoidectomia
III.	Atipia ou lesão folicular de significado indeterminado	6 – 18%	Repetir a PAAF*; considerar painéis de testes genéticos ou lobectomia
IV.	Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular	10 – 40%	Teste genético, lobectomia
V.	Suspeito de malignidade	45 – 60%	Tireoidectomia parcial ou total
VI.	Maligno	94 – 96%	Tireoidectomia parcial ou total

Nota: Adaptado de Cibas *et al.* 2017⁴⁶.

* A repetição da PAAF é capaz de fornecer diagnóstico acurado em cerca de 50% a 88% dos casos⁴⁷⁻⁵¹, porém no caso de manutenção da citologia na mesma categoria, deve-se considerar a possibilidade de tireoidectomia, pois nesses casos a chance de malignidade pode chegar a 10%⁴⁷.

Devido a alta taxa de resultados de citologia indeterminada (15-30%), que leva a cirurgias que não teriam indicação caso o diagnóstico pela PAAF fosse preciso, iniciou-se na última década a procura por métodos moleculares que melhorassem a precisão do diagnóstico de malignidade para esses casos. Inicialmente foram propostos como grandes diferenciais, mas benefícios concretos na prática clínica ainda precisam ser mais bem demonstrados.

Testes de mutações únicas como o *BRAF V600E* apresentam alta especificidade, mas baixa sensibilidade no diagnóstico do nódulo tireoidiano, tornando-os pouco aplicáveis na prática clínica^{52, 53}. Com isso, foram propostos painéis para pesquisa de mutações e o perfil de expressão gênica, disponíveis comercialmente no Brasil com custo elevado.

Os principais testes comerciais disponíveis no mercado, e também os dados dos principais estudos que os validaram, estão listados na Tabela 5.

Embora alguns apresentem resultados promissores, ainda não há nenhum teste disponível que possa, com segurança, ditar a conduta em nódulos com citologia indeterminada de forma isolada⁵⁴. As recomendações ainda colocam os testes moleculares como formas complementares de avaliação do nódulo, que não substituem o julgamento clínico, avaliação ultrassonográfica e citopatologia^{55, 56}.

Tabela 5. Comparação das características de performance dos testes moleculares disponíveis para avaliação de nódulos da tireoide.

Teste Molecular	Citologia (categoria Bethesda)	Número de casos	Prevalência de câncer	Sensibilidade	Especificidade	VPN	VPP
Thyroseq ^{57, 58}	III	96	23%	91%	92%	97%	77%
	IV	143	27%	90%	93%	96%	83%
Afirma ⁵⁹	III	129	24%	90%	53%	95%	38%
	IV	81	25%	90%	49%	94%	37%
RosettaGX. Reveal ⁶⁰	III, IV	150	21%	74%	74%	92%	43%
ThyGenX e ThyraMIR ⁶¹	III	58	33%	94%	80%	97%	68%
	IV	51	31%	82%	91%	91%	82%

Nota: Adaptado de Nikiforov, Y. 2017⁵⁴

Legenda: VPN: valor preditivo negativo; VPP: valor preditivo positivo.

Eszlinger *et al.*⁶² demonstraram que, na grande maioria dos casos em que foi utilizado algum tipo de painel comercial de testes genéticos, não houve benefício para os pacientes na prática clínica pois não influenciou a conduta de forma significativa. Noureldine *et al.*⁶³ também descrevem que não houve mudança significativa na conduta cirúrgica nos casos em que foram utilizados teste genéticos. No entanto, há autores que defendem seu uso, desde que com conhecimento das limitações dos testes disponíveis⁶⁴. Também há estudos de custo efetividade que sugerem que o seu uso pode diminuir número de cirurgias e consequente custos para os sistemas de saúde⁶⁵.

3.1.3. TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

O tratamento do carcinoma diferenciado da tireoide é principalmente cirúrgico, através da tireoidectomia.

Previamente à cirurgia, o paciente deve ser submetido a ultrassonografia cervical para avaliação linfonodal em compartimentos central e laterais^{66, 67}. Se houver suspeita de metástases linfonodais, deve ser realizada PAAF com citologia e dosagem de tireoglobulina no aspirado⁶⁸. O uso de exames de imagem seccionais como tomografia computadorizada ou ressonância magnética não é indicado para todos os pacientes e tem sua principal indicação em casos com suspeita de doença localmente avançada, com tumor primário invasivo ou metástases linfonodais volumosas⁶⁹.

Classicamente, o tratamento preconizado para todos os casos de carcinoma diferenciado da tireoide é a tireoidectomia total⁷⁰⁻⁷⁴. Com isso, poderiam ser diagnosticadas neoplasias multifocais, indicar iodoterapia quando necessário e fazer acompanhamento com a tireoglobulina como marcador sérico.

No entanto, nos últimos anos, há uma discussão crescente em relação ao tratamento do carcinoma diferenciado da tireoide na literatura. Devido ao seu comportamento indolente e aumento da incidência de casos iniciais, muitos acreditam que o tratamento deva ser mais conservador em casos de baixo risco e a tireoidectomia parcial é preconizada como tratamento dos casos de tumores menores que 1 cm, sem extensão extra-tireoidiana e sem metástases linfonodais^{29, 75-78}. Nos casos de tumores entre 1 e 4 cm, sem extensão extra-tireoidiana e sem metástases linfonodais pode ser feita a tireoidectomia total ou lobectomia. Nos casos de tumores acima de 4 cm,

extensão extra-tireoidiana evidente, metástases linfonodais ou a distância a tireoidectomia total deve ser o procedimento realizado⁴².

No contexto do tratamento menos agressivo para o carcinoma diferenciado da tireoide, cirurgiões do *Kuma Hospital* no Japão iniciaram em 1993 um protocolo para observação de pacientes de baixo risco e tumores menores que 1 cm. Ito *et al.*^{79, 80} mostraram nesses estudos baixas taxas de progressão (5% em 5 anos e 8% em 10 anos) com necessidade de operação apenas em 15,4% dos casos ao longo do acompanhamento, sem casos de irrecutabilidade e sem mortes durante o acompanhamento. O grupo advoga desde então o manejo não operatório de casos iniciais de baixo risco, através de vigilância ativa e cirurgia somente caso haja progressão da doença^{81, 82}. Tal proposta começou a ser aceita na literatura, principalmente após relatos iniciais de outros serviços^{83, 84}. No entanto, ainda não é consenso, principalmente por não haver dados de seguimento a longo prazo em populações fora do Japão. Na sua mais recente edição, as recomendações da ATA de 2015 para o manejo do câncer diferenciado da tireoide passaram a aceitar a observação em casos de muito baixo risco (tumores inferiores a 1 cm, sem metástases linfonodais ou a distância e sem evidência de histologia mais agressiva) ou em casos com risco cirúrgico muito elevado devido a outros fatores clínicos⁴². Foi o primeiro consenso fora do Japão a colocar essa opção.

O esvaziamento cervical do compartimento central (nível VI) deve ser realizado quando há evidência de metástases linfonodais. A incidência de micrometástases em séries em que foi realizado esvaziamento central de forma eletiva é alta (até 70%), mas os resultados mostram que o

esvaziamento eletivo em casos clinicamente N0 não impacta na sobrevivência, independentemente do estágio linfonodal patológico final^{85, 86}.

O esvaziamento eletivo do nível VI pode ser considerado em pacientes com tumores localmente avançados (T3 e T4) e em casos de metástase linfonodal lateral confirmada (N1b)⁴².

Já o esvaziamento cervical póstero-lateral (níveis II a V) deve ser realizado apenas quando há comprovação citológica de metástases linfonodais e apenas do lado com comprovação de doença⁴².

No pós operatório, o tumor deve ser classificado de acordo com a classificação TNM (Tabelas 6 e 7) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) para estimar o risco de mortalidade do paciente.

Tabela 6. Classificação do tumor (T), metástases linfonodais (N) e metástases a distância (M) de acordo com a AJCC (8ª edição).

ESTADIO T	DESCRIÇÃO
T1	Tumor com 2 cm ou menos no maior eixo, limitado à tireoide: - T1a: 1 cm ou menos no maior eixo; - T1b: mais de 1 cm, mas não mais do que 2 cm no maior eixo.
T2	Tumor menor do que 2 cm, mas não mais do que 4 cm no maior eixo, limitado à tireoide
T3	Tumor maior do que 4 cm no maior eixo limitado à tireoide ou com extensão extra-tireoidiana grosseira, com invasão da musculatura pré-tireoidiana : - T3a: maior de 4 cm limitado à tireoide; - T3b: tumor de qualquer tamanho com extensão extra-tireoidiana grosseira com invasão da musculatura pré-tireoidiana.
T4a	Tumor estende-se além da cápsula da tireoide e invade tecido subcutâneo, laringe, traqueia, esôfago e/ou nervo laríngeo inferior
T4b	Tumor invade a fáscia pré vertebral, vasos mediastinais ou envolve a artéria carótida
ESTADIO N	
N0	Ausência de linfonodos regionais metastáticos
N1a	Linfonodos metastáticos no compartimento central (pré-laríngeo, para-traqueal ou pré-traqueal)
N1b	Linfonodos metastáticos no compartimento lateral (níveis I a V), mediastino superior ou retrofaríngeos
ESTADIO M	
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Presença de metástases a distância

Nota: Adaptado de Amin *et al.*⁸⁷

Tabela 7. Estadiamento do carcinomas diferenciados da tireoide de acordo com a AJCC (8ª edição).

Idade: abaixo de 55 anos			
Estadio I	Qualquer T, qualquer N, M0		
Estadio II	Qualquer T, qualquer N, M1		
Idade: 55 anos ou mais			
Estadio I	T1a, T1b, T2	N0	M0
Estadio II	T3	N0	M0
	T1,T2, T3	N1	M0
Estadio III	T4a	Qualquer N	M0
Estadio IVa	T4b	Qualquer N	M0
Estadio IVb	Qualquer T	Qualquer N	M1

Nota: Adaptado de Amin *et al.*⁸⁷

Além disso, a ATA recomenda a estratificação de risco de recidiva em três níveis de acordo com critérios descritos na Tabela 8^{42, 88}.

Tabela 8. Estratificação de risco de acordo com a ATA.

RISCO	DESCRIÇÃO
Baixo risco	<ul style="list-style-type: none"> – Carcinoma papilífero com todas características abaixo: <ul style="list-style-type: none"> • ausência de metástases regionais ou à distância; • exérese macroscópica completa do tumor; • sem invasão locorregional de tecidos ou estruturas adjacentes; • ausência de histologia sugestiva de agressividade (por exemplo, células altas, insular, células colunares); • ausência de invasão vascular; • caso tenha sido administrado Iodo¹³¹ no pós-operatório, não tenha havido captação além do leito tireoidiano; • clinicamente N0 ou até 5 micrometástases patológicas (<0,2 cm) – Variante folicular encapsulada do carcinoma papilífero intratireoidiana;* – Carcinoma folicular diferenciado com invasão capsular e ausência de invasão vascular ou mínima invasão (menos de 4 focos); – Microcarcinoma papilífero unifocal ou multifocal, intratireoidiano incluindo <i>BRAF V600E</i> mutado.
Risco intermediário	<ul style="list-style-type: none"> – Invasão microscópica do tumor a partes moles peri-tireoidianas; – Presença de metástases cervicais ou de áreas de captação fora do leito tireoidiano quando administrado Iodo¹³¹ no pós-operatório; – Tumores com variantes agressivas ou com invasão vascular; – Clinicamente N1 ou mais de 5 linfonodos acometidos, todos menores que 3 cm no maior eixo; – Carcinoma papilífero multifocal com extensão extra-tireoidiana e <i>BRAF V600E</i> mutado.
Alto risco	<ul style="list-style-type: none"> – Invasão tumoral macroscópica (extensão extra-tireoidiana grosseira); – Ressecção tumoral incompleta; – Metástases à distância; – Níveis elevados de tireoglobulina pós-operatória sugestivos de metástases; – pN1 com qualquer linfonodo metastático maior que 3 cm no maior eixo; – Carcinoma folicular com invasão vascular extensa (mais de 4 focos).

Nota: Adaptado de Haugen *et al.*⁴²

* Observação: A partir de 2016 tal variante foi reclassificada para neoplasia tireoideana folicular não invasiva com características nucleares papilíferas⁸⁹

Após o tratamento cirúrgico, pode-se optar por tratamento adjuvante com iodo radioativo (I¹³¹). Tal complementação está indicada em pacientes classificados como de alto risco submetidos a tireoidectomia total. Nos casos de risco intermediário, a ablação por iodo pode ser considerada, levando em conta aspectos específicos de cada caso. Já em casos de baixo risco ela não deve ser rotineiramente empregada⁴².

O seguimento dos pacientes é realizado com supressão hormonal com levotiroxina com metas de níveis de TSH (hormônio tireoestimulante, do inglês *thyroid-stimulating hormone*) baseadas na estratificação de risco (TSH < 0,1 mU/L no alto risco; entre 0,1 e 0,5 mU/L no risco moderado e entre 0,5 e 2,0 mU/L no baixo risco), além de ultrassonografia cervical e exame de imagem do tórax periodicamente ^{42, 90}.

Esses indivíduos são também seguidos com dosagens séricas de tireoglobulina a cada 6 ou 12 meses. Trata-se de uma glicoproteína que é produzida exclusivamente por tecido tireoidiano normal ou células foliculares neoplásicas e que, portanto, representa um marcador de alta acurácia do CDT especialmente na ausência de anticorpo antitireoglobulina⁹⁰. É considerada uma resposta excelente ao tratamento quando obtemos valores inferiores a 0,2 ng/mL com TSH suprimido e inferiores a 1 ng/mL quando estimulado pelo TSH elevado. Tireoglobulina suprimida acima de 1 ng/mL e estimulada acima de 10 ng/mL caracterizam quadros de resposta bioquímica incompleta e devem, eventualmente, ser investigados⁴².

A ocorrência de metástases a distância no CDT não é comum e é descrita em 1% a 28% dos casos, sendo associada a pior prognóstico⁸⁻¹¹. No momento do diagnóstico, cerca de 1% a 8% dos carcinomas papilíferos e 8% a 33% dos carcinomas foliculares terão metástases a distância⁹¹ e até 50% desses pacientes morrem em 5 anos⁹².

Embora com doença disseminada, o tratamento cirúrgico do tumor primário nesses pacientes é essencial para permitir o tratamento complementar com iodo radioativo (muitas vezes as metástases são responsivas ao iodo) e para controle local⁹². Tal tratamento deve ser a

tireoidectomia total e esvaziamento cervical conforme necessidade.

O sítio mais comumente acometido pelas metástases do CDT é o pulmão, seguido por metástases ósseas. Estudos mostram que as metástases a distância restritas ao pulmão apresentam melhor prognóstico do que pacientes que têm doença em outros órgãos^{92, 93}. Além disso, outros fatores relacionados ao prognóstico nesses pacientes são a idade no momento do diagnóstico, presença de metástase em mais de um local, volume de doença pulmonar e se as metástases são ávidas por iodo. Até 60% dos casos de metástases captantes tem uma resposta favorável ao tratamento com iodo e há relatos de até 24% de cura⁹⁴.

3.1.4. MORTALIDADE

A mortalidade relacionada ao CDT é muito baixa, descrita na literatura como sendo inferior a 5% em 10 anos^{16-18, 95}. Por ser um desfecho raro em uma doença com evolução lenta, o estudo da mortalidade em CDT é extremamente difícil.

Na literatura há análises retrospectivas e séries descritivas de diferentes serviços, mas não há trabalhos prospectivos sobre o assunto. Isso pode ser explicado justamente pela raridade do desfecho: seria necessário acompanhar um grupo muito grande de doentes por muito tempo para verificar um número mínimo de mortes. Como outro fator complicador para o estudo da mortalidade por CDT está o fato de alguns trabalhos agruparem todos os tipos histológicos de câncer da tireoide, inclusive carcinomas anaplásicos que têm um prognóstico significativamente pior. Pelo comportamento clínico

totalmente diferente dos tipos histológicos distintos, alguns com alta mortalidade, sabe-se que tais resultados devem ser analisados com cautela.

Existem alguns fatores que classicamente são associados a pior prognóstico e conseqüentemente com maior mortalidade, sendo os principais deles extensão extra-tireoidiana grosseira (T4), metástases a distância e a idade ao diagnóstico acima de 45 anos^{12, 96-102}. No entanto, alguns fatores como metástases linfonodais, gênero e invasão vascular permanecem com papel controverso na mortalidade por CDT^{98, 103, 104}.

Resumidos na Tabela 9 estão os achados de alguns dos principais estudos de sobrevivência em CDT. No entanto, esses dados são muito heterogêneos no que diz respeito a tratamento (extensão da cirurgia, indicação de radioiodoterapia etc.) e tipos histológicos incluídos, fatores que dificultam a interpretação dos dados.

Tabela 9. Estudos de sobrevivência em carcinoma diferenciado da tireoide.

Estudo	Número de pacientes incluídos	Seguimento médio em anos (amplitude)	Sobrevivência	Fatores associados a mortalidade
Simpson <i>et al.</i>¹⁰⁵	1.074	6,5 (4-24)	20 anos: CPT 95% CFT 81%	T4, idade, M1, N1, grau de diferenciação
DeGroot <i>et al.</i>¹⁰⁶	269	12 (1-38)	10 anos: ~95%, 20 anos: ~90%	Idade, T
Akslen <i>et al.</i>⁹⁸	2.479	2 (?-16)	5 anos: homens 74,9%; mulheres 81,9%	Idade, sexo, T
Brennan <i>et al.</i>¹⁰⁷	100 (CFT)	-	10 anos: 87% 20 anos: 71%	Idade, invasão, M1
Samaan <i>et al.</i>¹⁰⁸	1.599	11 (?-43)	-	Idade
Shah <i>et al.</i>¹⁰⁹	931	-	10 anos: 87%	CFT, T, EET, M1
Hay <i>et al.</i>¹⁷	1.779 (CPT)	12,7	10 anos: 96% 20 anos: 95%	Índice prognóstico MACIS
Mazzaferri <i>et al.</i>¹⁶	1.355	15,7 (0,5-47)	10 anos: 94,7% 20 anos: 89,9%	Idade, sexo, T, N
Gilliland <i>et al.</i>¹¹⁰	14.517	10	10 anos: 92-98%	Idade, sexo, T
Lerch <i>et al.</i>¹⁰¹	500	5,8 (0-23)	5 anos: 92%	T4, M1
Bellantone <i>et al.</i>¹¹¹	234	7,2 (0-28)	10 anos: 86,7% 20 anos: 70,6%	Idade, tamanho do tumor
Tsang <i>et al.</i>¹¹²	382	10,8	10 anos: CPT 93%; CFT 69%	Idade, T, M1 grau de diferenciação
Hundahl <i>et al.</i>⁹	49.450	10	10 anos: 85-93%	Idade, T
Kuijpers <i>et al.</i>¹¹³	260	7,6 (1,2-34)	10 anos: 75%	Sexo, T
Tzavara <i>et al.</i>¹¹⁴	609	5,5 (1-38)	10 anos: CPT 95%; CFT 90%	Idade, T, N1, M1, sexo
Steinmuller <i>et al.</i>¹⁰²	139	6 (0-19)	10 anos: CPT 92%; CFT 88%	Idade, T4, M1
Duren <i>et al.</i>¹¹⁵	1.000	14	20 anos: 92%	-
Lin <i>et al.</i>¹¹⁶	394	6,3	10 anos: 90%	Idade, T, sexo
Hay <i>et al.</i>¹¹⁷	2.444 (CPT)	-	25 anos: 95%	Índice prognóstico MACIS
Chow <i>et al.</i>¹¹⁸	1.057	9,2	10 anos: CPT 92%; CFT 81%	Idade, T4, M1
Bhattacharyya <i>et al.</i>¹¹⁹	18.118	10	10 anos: CPT 88%; CF: 80%	Idade, T4, histologia
Lundgren <i>et al.</i>¹²⁰	5.554	15-17	10 anos: 63,8-86,2%; 20 anos: 48,6-84,4%	Idade, sexo histologia
Eichhorn <i>et al.</i>¹²¹	484	7,6 (0,2-23,9)	10 anos: 90%	Idade, M1, sexo
Palme <i>et al.</i>¹²²	574	7 (1-34)	20 anos: 60-100%	Recidiva

Legenda: CPT: carcinoma papilífero da tireoide, CFT: carcinoma folicular da tireoide, EET: extensão extra-tireoideana, T: estadió relacionado ao tumor pela classificação TNM, N: estadió relacionado aos linfonodos na classificação TNM, M: estadió relacionado a metástases na classificação TNM; ~ aproximadamente.

Nota: Adaptado de Eustatia-Rutten *et al.*⁹⁶

Em um estudo baseado na base de dados do SEER, Nilubol *et al.*¹²³ analisaram 61.523 casos de carcinomas da tireoide, com 1.753 mortes pela doença. Destas, 912 (52%) confirmadas como neoplasias diferenciadas. O foco do estudo foi nas lesões menores que 2 cm, que corresponderam a 12,3% dos óbitos, sendo que 5,1% foram lesões inferiores a 1 cm. A análise multivariada evidenciou que a idade acima de 45 anos, extensão extra-tireoidiana, metástases linfonodais, metástases a distância e tratamento menor do que lobectomia foram associados com maior mortalidade. Os autores defendem que a observação de casos de carcinomas papilíferos T1 deve ser abordada com muita cautela, principalmente por fatores associados a pior prognóstico não poderem ser verificados com segurança previamente à operação.

Conforme fica evidente na Tabela 9, a idade é um forte indicador prognóstico, e o limite de 45 anos foi incluído na classificação da AJCC desde sua segunda edição e se manteve até recentemente. No entanto, alguns autores iniciaram o questionamento da linha de corte nos 45 anos. Ganly *et al.*¹²⁴ demonstraram, em estudo de 2015, que a mortalidade aumenta progressivamente conforme a idade ao diagnóstico, sendo 37 vezes maior em pacientes acima de 70 anos do que nos abaixo de 40 anos, mas não identificaram nenhum valor de corte específico em que haja diferença na mortalidade. Uma análise baseada na base de dados do SEER com 53.581 pacientes, mostrou que a sobrevivência acumulada em 5 anos diminui conforme a idade aumenta, estratificada em cinco categorias de 20 a 84 anos. Entretanto, a sobrevivência manteve-se acima de 90% para pacientes abaixo de 65 anos¹²⁵. Já um estudo multicêntrico de 2016 com 9.484 pacientes

validou o corte em 55 anos como fator prognóstico, mostrando maior acurácia como fator definidor de risco e mostrou ainda que 12% dos pacientes seriam reclassificados para um estágio mais baixo, com benefício clínico evidente¹²⁶. Com isso, tal valor de corte foi adotado na atualização do TNM 8ª edição publicada em 2017⁸⁷.

Os outros fatores prognósticos associados a sobrevivência pelo manual de estadiamento da AJCC estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Fatores prognósticos associados a menor sobrevivência em carcinoma diferenciado da tireoide.

Fatores prognósticos	Relacionados ao tumor	Relacionados ao hospedeiro	Relacionados ao ambiente
Essenciais	Extensão extra-tireoidiana (categoria T), categoria M, tireoglobulina pós-operatória.	Idade	Doença residual: ressecção completa, doença microscópica residual (R1), doença macroscópica residual (R2).
Adicionais	Categoria N, localização das metástases, mutação <i>BRAF V600E</i> .	Sexo	Extensão da ressecção, ablação com iodo, bócio endêmico.
Novos e promissores	Perfil molecular.	-	-

Nota: Adaptado de Amin *et al.*⁸⁷

A extensão extratireoideana é um fator associado com pior prognóstico, mas não há muitos estudos sobre sua associação com a mortalidade. Youngwirth *et al.*¹²⁷ publicaram uma análise com os dados da base de dados americana *National Cancer Database* (NCDB) que incluiu 241.118 pacientes com CDT. Nesse estudo, foi evidenciada uma diferença significativa na sobrevivência em 5 anos entre pacientes sem extensão extratireoideana, com extensão extratireoideana mínima e com extensão

extratireoideana extensa (96%, 94% e 88%, respectivamente), demonstrando a associação dessa variável com a mortalidade.

A extensão extratireoideana microscópica não é considerada um fator prognóstico importante e, por isso, na última versão do TNM (8ª edição) deixou de ser um fator que classifica um tumor como T3, o que ocorria na versão anterior. Apenas a extensão grosseira é a indicativa de tumores mais avançados na classificação atual⁸⁷.

A invasão vascular é considerada por muitos um forte fator prognóstico, no entanto isso não é consenso¹²⁸⁻¹³⁰. Sua incidência no CDT é baixa na maior parte dos estudos, porém varia de 2,5 a 52%, sendo mais frequente em carcinomas foliculares^{103, 128, 131}. Em uma metanálise recente, Vuong *et al.*¹³² demonstraram que a invasão vascular está associada com maior recidiva locorregional e a distância, assim como fator de risco independente para mortalidade pela doença.

As metástases a distância estão classicamente associadas com pior prognóstico⁹⁶. No entanto, há grande diferença de comportamento entre casos metastáticos. Há casos com evolução lenta e indolente, com sobrevivência de até 30 anos¹³³, e outros extremamente agressivos. Fatores clássicos como tipo histológico e estadiamento TNM não oferecem uma forma segura de diferenciá-los. Nessa linha de pesquisa, Robbins *et al.*¹³⁴ analisaram o papel da tomografia computadorizada com emissão de pósitrons (PET, do inglês *Positron emission tomography*) nesse contexto. Demonstraram em uma coorte de 907 pacientes que os casos metastáticos com PET positivo apresentaram risco de morte 7,28 vezes maior que os com PET negativo. Tal associação está baseada no conceito de que a alta atividade metabólica

demonstrada pela captação no PET acontece em tumores desdiferenciados ou até mesmo indiferenciados, e que não apresentam captação na pesquisa de corpo inteiro (PCI).

Estudos específicos de pacientes com metástases a distância são pouco frequentes na literatura, especialmente os que estudam fatores associados ao óbito entre esses casos. Há muita heterogeneidade entre os estudos, principalmente na seleção dos pacientes quanto ao tipo histológico, momento do diagnóstico e sítio das metástases, tornando complexa a comparação entre eles. Os principais fatores associados a maior mortalidade entre os pacientes metastáticos são idade acima de 45 anos, metástases extra-pulmonares e metástases que não captam iodo^{10, 12, 92, 104, 135-138}.

Durante a evolução da doença, cerca de 5% dos casos de CDT podem apresentar uma perda da diferenciação celular, o que gera uma perda da capacidade da célula em captar iodo e comportamento clínico mais agressivo, tanto locorregional quanto a distância. Tal aspecto, chamado de desdiferenciação, é pouco explorado na literatura, mas associado com maior mortalidade¹³⁹.

Ao analisar-se a causa específica de morte nesses pacientes, percebe-se que os primeiros relatos nesse assunto datam dos anos 1960 e mostram a progressão de doença local com invasão de via aérea como causa importante de morte, quase tão importantes quanto as metástases a distância.

Tollefsen *et al.*¹⁴⁰, em 1964, descrevem 70 casos de óbito por carcinoma papilífero, sendo a principal causa de morte a recidiva/persistência de doença local (40%). Nessa casuística, 87% dos pacientes tinham doença residual no pescoço no momento da morte e apenas nove morreram em

decorrência de metástases a distância sem evidência de doença locorregional. Descrevem o tratamento inicial inadequado como principal fator associado com mortalidade: dos 28 que morreram por progressão local apenas 12 tinham sido submetidos a tireoidectomia inicialmente.

Em 1988, Smith *et al.*¹⁴¹ publicaram estudo caso-controle de 56 mortes por carcinoma papilífero tratados na *Mayo Clinic*. Evidenciaram a idade, invasão local de nervo laríngeo inferior e metástases no diagnóstico como preditores de pior prognóstico. A morte por invasão local teve uma incidência semelhante à por falência pulmonar relacionada a metástases (36% e 37%, respectivamente), seguida de 21% por causas neurológicas (metástases no sistema nervoso central).

Ao longo das décadas, pode-se notar uma mudança no perfil das causas de óbito, que passam a ocorrer principalmente em decorrência de metástases a distância e raramente por doença local. Tal fato provavelmente decorre do diagnóstico mais precoce da doença, além de tratamentos iniciais mais agressivos com tireoidectomia total e esvaziamentos cervicais regradados quando indicados, além do uso da radioiodoterapia.

Beasley *et al.*¹³ em 2001 relataram dez casos de óbitos por CDT. As metástases a distância foram responsáveis por oito mortes e a doença local por apenas dois casos. Associam a mortalidade com doença avançada desde a apresentação inicial, sendo que todos os casos tinham metástases linfonodais, extensão extra-tireoidiana ou metástases a distância no diagnóstico e idade acima de 49 anos.

Nixon *et al.*¹⁴ relataram, em estudo retrospectivo de 2011, 17 casos de óbito relacionados a CDT em pacientes que foram considerados livres de

doença após o tratamento inicial. Descreveram uma mortalidade de 1,3% com metástases a distância como a principal causa de morte (88%). Apenas dois casos apresentaram recidiva local que pode ter influenciado o desfecho, também associados a metástases pulmonares. Todos os casos de morte eram pacientes de risco intermediário ou alto risco pela classificação da ATA.

3.1.5. PATOGÊNESE

Nas últimas décadas, uma série de alterações genéticas e moleculares relacionadas à gênese do CDT foram amplamente estudadas¹⁴². Sabe-se que a iniciação e a progressão do CDT envolvem o acúmulo de uma série de alterações genéticas e epigenéticas^{25, 143}. Atualmente, a definição dos eventos genéticos que levam à gênese tumoral é possível na maioria dos casos, mas a conversão desse conhecimento biológico para aplicabilidade clínica ainda deve ser buscada.

As alterações genéticas mais frequentemente atribuídas à ativação de proto-oncogenes relacionadas ao desenvolvimento dessas neoplasias são as mutações pontuais dos genes *BRAF* e *RAS* e rearranjos do *RET/PTC*¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Também são encontradas outras mutações que levam a inativação de genes como o *p53* e o *PPAR-γ*¹⁴².

BRAF é um gene que codifica a BRAF, uma proteína quinase serina/treonina da família das proteínas RAF que são efetores da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). A MAPK é uma via de sinalização intracelular que atua no crescimento celular, proliferação, apoptose e diferenciação celular. Mutações no *BRAF* podem ativar essa via⁵⁶.

Mutações do gene *BRAF* (particularmente V600E) são as alterações

mais frequentemente encontradas no carcinoma papilífero e as mais estudadas, com uma prevalência descrita que chega a 85%^{146, 148, 149}, mas na média ocorre em 40% dos CPT^{150, 151}.

Sua associação com maior agressividade é bem demonstrada, principalmente com diminuição da expressão de genes relacionados à capacidade de captar iodo^{152, 153} e recorrência. Uma metanálise com 5.000 pacientes mostrou associação da mutação com aumento na taxa de extensão extra-tireoideana, metástases linfonodais, estágio avançado e um risco 2,14 vezes aumentado de recorrência e persistência de doença¹⁵⁴. Um estudo retrospectivo com 1.849 pacientes mostrou maior mortalidade específica nos pacientes com *BRAF* mutado, no entanto tal associação não foi independente de outros fatores tumorais¹⁵⁵.

Embora a maior parte dos autores tenha demonstrado a associação da mutação com maior mortalidade, tal achado também é contestado. Henke *et al.*¹⁵⁶ não verificaram diferença significativa na sobrevivência global e livre de doença nos pacientes com *BRAF* mutado ou não mutado em 8 anos. Ainda, uma metanálise recente relata a associação da mutação com menor sobrevivência livre de doença e global nos primeiros 5 anos, mas tal associação se perde no seguimento acima de 5 anos¹⁵¹.

Apesar da sua forte associação com agressividade, o papel do *BRAF* como marcador prognóstico é limitado pela sua baixa especificidade. Embora tenha sensibilidade de 65%, apresenta valor preditivo positivo de apenas 25%¹⁵⁷. Seu papel como fator associado a recorrência é reconhecido pela ATA, mas seu papel como fator independente de risco permanece incerto, e estudos recentes mostram uma possível associação com a mutação do gene

promotor do TERT como fator relacionado ao CPT realmente agressivo¹⁵¹.

Já o rearranjo *RET/PTC* está associado exclusivamente ao carcinoma papilífero e o seu papel na patogênese tumoral já foi amplamente descrito^{158, 159}. No entanto, estudo recente do genoma humano mostrou que a mutação foi o evento genético inicial em apenas 6,8% dos casos¹⁶⁰. Há estudos que mostram que o *RET/PTC1* está associado com comportamento favorável no CPT¹⁶¹, o que contrasta com evidências que mostram que o *RET/PTC3* pode estar associado com desdiferenciação e comportamento agressivo¹⁶². Essas controvérsias sobre o valor prognóstico tornam seu uso ainda limitado.

Enquanto que as mutações de *BRAF* e *RET/PTC* são específicas do carcinoma papilífero¹⁶³, mutações do proto-oncogene *RAS* são encontradas em menores proporções nos carcinomas papilífero (10-20%) e maior (40-50%) nas lesões de padrão folicular (carcinoma folicular, carcinoma papilífero variante folicular e também nos adenomas foliculares)¹⁶⁴. As proteínas homólogas *RAS* (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*) transmitem sinais oriundos de receptores de membrana para diversos efetores intracelulares e também atuam na via *MAPK*¹⁶⁵.

Existem estudos que associam a mutação *RAS* com metástases a distância e pior prognóstico nos carcinomas foliculares^{166, 167}, no entanto o uso dessa mutação como fator prognóstico é muito restrito devido à sua alta prevalência nos adenomas foliculares (20-25%)¹⁶⁸.

O rearranjo *PAX8-PPAR-γ* é encontrado em até 45% dos carcinomas foliculares, em 4% a 33% dos adenomas foliculares e raramente em carcinomas com características oncocíticas¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Os rearranjos *RET/PTC* são frequentes no carcinoma papilífero enquanto o rearranjo *PAX8-PPAR-γ* é

mais frequente em lesões com características foliculares (carcinoma papilífero variante folicular e carcinoma folicular). No geral, a literatura indica que tumores com essas alterações raramente progridem para formas indiferenciadas e agressivas. No entanto, o papel desses rearranjos na determinação de prognóstico nos CDT permanece indefinida¹⁷².

Mais recentemente, em 2013, mutações no gene promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*; do inglês *telomerase reverse transcriptase*) foram descritas inicialmente como fatores prognósticos promissores para o CDT¹⁷³. A telomerase é uma proteína complexa que regula o comprimento do telômero no final dos cromossomos. Na maior parte dos tecidos sadios, a atividade da telomerase está inibida e isso faz com que o comprimento dos telômeros diminua a cada ciclo de multiplicação celular, eventualmente atingindo um tamanho crítico que faz a célula entrar em um processo de senescência. A expressão da telomerase é considerada um marco na gênese tumoral e está expressa em mais de 90% dos cânceres humanos. As duas mutações descritas (C228T e C250T) aumentam a atividade do gene promotor da TERT, estando associadas a aumento da atividade da telomerase e manutenção do comprimento estável dos telômeros¹⁷⁴.

Estudos mostram uma associação do *TERT* com idade mais avançada no diagnóstico, tumores maiores e principalmente com metástases a distância. Tais resultados são promissores, mas ainda não totalmente definitivos, especialmente devido ao fato de a mutação *TERT* ter uma alta associação com *BRAF*, o que poderia ser um fator de confusão^{173, 175, 176}.

No entanto, estudos mais recentes mostram que na realidade existe uma

forte associação da mutação de ambos os genes (*TERT* e *BRAF*) com um pior prognóstico, superior a cada uma de forma isolada¹⁷⁷.

Uma metanálise de Moon *et al.*¹⁷⁸ analisou o papel das mutações *BRAF* V600E e *TERT* no prognóstico e paciente com CPT e verificou que a mutação *TERT* isolada tem pouco impacto; no entanto, existe uma forte relação da associação dessas duas mutações com um pior prognóstico, inclusive com maior mortalidade.

Liu *et al.*¹⁷⁷ analisaram, em um estudo retrospectivo, 1.051 pacientes com CPT seguidos por uma média de 89 meses. Compararam mortalidade específica em casos sem nenhuma mutação, *BRAF* mutado isolado, *TERT* mutado isolado e a dupla mutação *BRAF* e *TERT* e verificaram uma mortalidade de 0,6 %, 2,4% , 6,3 e 22,7%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre a mortalidade específica nos casos com mutações isoladas de *BRAF* e *TERT*.

Há ainda a hipótese de que os carcinomas papilífero e folicular possam progredir para carcinomas pouco diferenciados ou anaplásicos, sendo a inativação do proto-oncogene *p53* uma alteração genética bem estabelecida¹⁷⁹.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO

Trata-se de estudo de coorte retrospectivo baseado em dados de prontuário para levantamento de dados clínicos e análise de marcadores moleculares a partir de espécimes cirúrgicos parafinados.

4.2. ÉTICA

Este projeto foi autorizado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 176/15 (Anexo A).

4.3. CASUÍSTICA

Inicialmente, através de análise de banco de dados, foram selecionados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) todos os pacientes que apresentavam doença metastática pulmonar de carcinoma diferenciado de tireoide entre maio de 2009 e dezembro de 2015 para estudo retrospectivo de fatores relacionados a menor sobrevivência específica, com um total de 54 pacientes.

Posteriormente, foi realizada busca ativa a partir de bancos de dados de pacientes com neoplasia maligna de tireoide para identificar pacientes que haviam morrido em decorrência de CDT, com um total de 33 pacientes. Pacientes que morreram por causas não relacionadas ao CDT foram excluídos do estudo.

Através da análise de prontuários, foram identificados dados demográficos e clínicos desses pacientes, listados a seguir: sexo, idade, data do diagnóstico, procedimento cirúrgico realizado, ressecção completa do tumor, tipo histológico e características (subtipo, estadiamento TNM, multifocalidade), realização de radioiodoterapia (data, número de sessões e dose acumulada), dosagem de tireoglobulina estimulada, refratariedade ao tratamento com iodo, recidiva locorregional (local e data), presença de metástases a distância (data, local e tratamento), data e causa de morte.

Todos os pacientes operados foram tratados cirurgicamente através de tireoidectomia total e o esvaziamento cervical foi realizado na evidência de metástases linfonodais. Tratamento complementar com iodoterapia foi indicado em casos T3 ou T4, multifocalidade, variantes histológicas agressivas, metástases linfonodais ou a distância.

O seguimento foi feito conforme protocolo institucional: exame clínico e dosagem de hormônios tireoidianos (TSH e T4 livre), tireoglobulina e anticorpo anti-tireoglobulina a cada seis meses; ultrassonografia cervical, radiografia de tórax e pesquisa de corpo inteiro (casos selecionados) anualmente. Tomografia computadorizada foi realizada apenas em alguns casos, conforme necessidade (avaliação detalhada de primários ou metástases extensas e suspeita de metástase a distância). Recidiva locorregional foi estabelecida

através de confirmação histológica ou citológica, enquanto metástases a distância foram diagnosticadas através de exames de imagem característicos (tomografia computadorizada ou pesquisa de corpo inteiro).

A refratoriedade a iodoterapia foi estabelecida conforme definição do manual da *American Thyroid Association* de 2015⁴²: tecido maligno ou metastático que nunca concentrou iodo radioativo; tecido tumoral que perdeu a capacidade de concentrar iodo radioativo quando a mesma estava presente previamente; alguns tecidos concentram iodo enquanto outros não concentram ou progressão de doença metastática mesmo com concentração significativa de iodo.

Foram analisados os intervalos de tempo entre diagnóstico do tumor, diagnóstico da metástase a distância, progressão de doença e óbito para análise de sobrevivência.

Considerou-se a presença de desdiferenciação tumoral o caso no qual houve uma transformação abrupta de um tumor bem diferenciado para uma neoplasia de alto grau com perda das características histológicas distintas iniciais. O componente de alto grau é caracterizado por pleomorfismo, necrose acentuada e alto grau de proliferação celular¹⁸⁰. Características compatíveis com desdiferenciação foram identificadas em espécimes anatomicopatológicos de doença metastática, linfonodal ou a distância ou nas recidivas locorregionais.

A partir dos casos selecionados que morreram por CDT, foram solicitados os blocos de parafina dos materiais referentes a neoplasia de tireoide estocados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os casos em que havia

material do tumor primário disponível foram separados e os blocos com a maior proporção de tumor foram selecionados para a análise das mutações dos genes *BRAF* nos carcinomas papilíferos, *RAS* nos carcinomas foliculares e *TERT* em ambos.

4.4. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES GÊNICAS

4.4.1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO DE TECIDOS FIXADOS EM FORMALINA E EMBEBIDOS EM PARAFINA

Para a extração do DNA genômico utilizamos o protocolo para FFPE (do inglês, formalin-fixed paraffin-embedded) estabelecido por Kizys et al¹⁸¹. Cortes histológicos do tecido FFPE na espessura de 10 µm foram obtidos em micrótomo e coletados em microtubos (1-3 cortes). A desparafinização foi realizada por duas incubações em xilol a 65°C por 30 minutos cada. Após centrifugação a 15.600g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a lavagens subsequentes em etanol 100%, etanol 70% e água intercaladas por centrifugações a 15.600g por 1 minuto. Posteriormente, a lise celular foi promovida pela incubação em 600µl de tampão contendo Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, SDS 0,1% e proteinase K 20mg/ml a 56°C por 3 horas, seguida de incubação a 95°C por 10 minutos para inativação da enzima e transferência das amostras a 4°C por 1 minuto. Para precipitação do DNA a amostra foi incubada com 200µl de solução composta de acetato de potássio 3M e ácido acético glacial 11,5%, centrifugada a 15.600g por 5 minutos e o sobrenadante coletado em um novo microtubo. Posteriormente, foram adicionados 600µl de isopropanol e, após

centrifugação, o precipitado resultante foi lavado em etanol 70% e eluído em água livre de nucleases. Alíquotas do DNA obtido foram utilizados para quantificação no Biomate 3 (Thermo Fischer Scientific®, Waltham, MA, EUA).

4.4.2. AMPLIFICAÇÃO DOS SEGMENTOS GENÔMICOS DOS GENES *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS* E REGIÃO PROMOTORA DE *TERT* POR PCR

Para a amplificação da sequência gênica de *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS* e região promotora de *TERT* foi utilizada a metodologia *nested*-PCR que consiste na ampliação de um segmento mais amplo do gene (PCR I), seguida de uma amplificação da região *hotspots* dos genes (PCR II). Para tanto, dois pares de *primers* específicos para cada gene foram obtidos com o auxílio do programa *Primer-BLAST*¹⁸² (Tabela 11). Na PCR I, 400ng de DNA genômico foram incubados no volume final de 25µL de solução contendo: 400nM do *primer forward* e do *reverse*, 5µl de *My Taq DNA Polymerase Buffer* 5X, 0,2mM de dNTP e 1µl *My Taq DNA Polymerase* (Bioline®, Meridian Bioscience®, Cincinnati, Ohio, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystem, Thermo Fischer Scientific®, Waltham, MA, EUA) nas seguintes condições: pré-denaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 repetições de denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 51-60°C por 35-40 segundos e extensão a 72°C por 35 segundos, e fase final de extensão de 72°C por 7 minutos. Ao término, 2µl do produto amplificado da PCR I foram utilizados como *template* da PCR II. As condições de amplificação e o tamanho do segmento amplificado para cada um dos genes estão listadas na Tabela 11.

Tabela 11. Sequência de *primers* utilizados para amplificação dos genes de interesse por *nested-PCR*.

GENE	POSIÇÃO		SEQUÊNCIA DO PRIMER	TA	TE	TAMANHO
BRAF	T1799A	PCR I	5'-GACTCTAAGAGGAAAGATGAAGTA-3' 5'-GATTTTGTGAATACTGGGAAGTATGA-3'	58°C	40"	390 pb
		PCR II	5'-AAACTCTTCATAATGCTTGCTTGCTCTG-3' 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGA-3'	60°C	35"	231 pb
NRAS	A182G	PCR I	5'-GCTTATTTAACCTTGGCAATAGCA-3' 5'-GTGGTAACCTCATTTCCCCATA-3'	51°C	35"	349 pb
		PCR II	5'-CACACCCCCAGGATTCTTAC-3' 5'-TGGCAAATACACAGAGGAAGC-3'	53°C	35"	150 pb
HRAS	G34A	PCR I	5'-CTGTGGGTTTGCCCTTCAGA-3' 5'-CTATCCTGGCTGTGCTCCTGG-3'	51°C	35"	326 pb
		PCR II	5'-ATGACGGAATATAAGCTGGT-3' 5'-CTCTATAGTGGGGTCGTATT-3'	53°C	35"	111 pb
KRAS	G34T G34C G34A G35C G35A G35T	PCR I	5'-ACTGGTGGAGTATTTGATAGTGAT-3' 5'-ACTTGAAACCCAAGGTACATTTTCAG-3'	51°C	35"	350 pb
		PCR II	5'-AAGGCCTGCTGAAAATGACTG-3' 5'-CAAAGAATGGTCCTGCACCAG-3'	53°C	35"	173 pb
KRAS	C181A A182T A182C A182G	PCR I	5'-TCCAGACTGTGTTTCTCCCT-3' 5'-TGCATGGCATTAGCAAAGACTC-3'	51°C	35"	287 pb
		PCR II	5'-AGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGA-3' 5'-AACCCACCTATAATGGTGAATATCT-3'	53°C	35"	177 pb
TERT	C250T C228T	PCR I	5'-ACGAACGTGGCCAGCGGCAG-3' 5'-CTGGCGTCCCTGCACCCTGG-3'	60°C	35"	474 pb
		PCR II	5'-CAGCGCTGCCTGAAACTC-3' 5'-GTCCTGCCCTTCACCTT-3'	60°C	35"	163 pb

Legenda: TA = temperatura de anelamento; TE = tempo de extensão; pb = pares de base.

4.4.3. ANÁLISE DE MUTAÇÃO GÊNICA EM AMOSTRAS FFPE PELO MÉTODO DE SANGER

O produto obtido da PCR II foi submetido a fracionamento em eletroforese de gel de agarose 1% e o segmento correspondente ao tamanho amplificado (Tabela 11) foi recortado e purificado utilizando um kit de extração (*QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen®, Hilden, Alemanha). Para o sequenciamento capilar pelo método de Sanger, a amostra foi misturada à

solução de nucleotídeos fluorescentes de acordo com as instruções do fabricante (*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* - Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific®, Waltham, MA, EUA), e aplicada no equipamento *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific®, Waltham, MA, EUA). As sequências geradas foram analisadas utilizando o programa *Sequence Scanner 2* (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific®, Waltham, MA, EUA) (Figura 1). A identificação dos sítios de mutação foi obtida pelo programa de alinhamento no banco de dados público BLAT para genoma humano¹⁸³.

Figura 1. Imagem representativa do eletroferograma do gene *BRAF* contendo o *hotspot* T1799A (destaque em amarelo) obtida do sequenciamento pelo método de Sanger. A. sequência selvagem. B. sequência mutada.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos de cada variável contínua foram descritos através da média e desvio padrão (DP) ou pela mediana seguida da amplitude, pela distância interquartílica (diferença entre os percentis 75 e 25) ou pelo intervalo de confiança de 95% (IC95%). Frequências relativas e absolutas foram

usadas para descrever dados qualitativos. As distribuições foram definidas como paramétricas ou não paramétricas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Comparações da frequência de um fenômeno entre grupos de variáveis qualitativas foram realizadas com a aplicação do teste exato de Fisher ou do teste do qui-quadrado. Já nas comparações de uma variável quantitativa entre duas populações amostrais não paramétricas, foi empregado o teste de Mann-Whitney. O modelo de regressão de Cox foi empregado em ambas as análises univariada (método *enter*) e multivariada (método *backward likelihood ratio*, *LR*) - este teste é baseado na probabilidade estatística da razão de verossimilhança com base nas estimativas máximas de verossimilhança parciais) com o cálculo de *hazard ratio* (HR) e IC95%. Para a análise multivariada foram incluídas somente as variáveis com $p < 0,10$ à análise univariada. O método Kaplan-Meier foi utilizado para as análises de sobrevivência, e o teste de *log-rank* foi empregado na comparação das curvas. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS® versão 17.0 (SPSS® Inc; Illinois, EUA) e valores de p menores que 5% ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. FATORES PREDITIVOS DE MORTE EM PACIENTES COM METÁSTASES PULMONARES DE CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE

Foram identificados 54 pacientes com doença metastática pulmonar que foram acompanhados no ICESP entre maio 2009 e dezembro de 2015, sendo 41 carcinomas papilíferos e 13 carcinomas foliculares. A maioria dos casos era do sexo feminino (64,8%) e a média de idade foi de $51,6 \pm 16,8$ anos. Os dados descritivos dessa casuística encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Dados descritivos dos pacientes com metástases pulmonares de carcinoma diferenciado da tireoide.

VARIÁVEL	n	%
Sexo		
Feminino	35	64,8
Masculino	19	35,2
Idade		
> 45 anos	37	68,5
≤ 45 anos	17	31,5
Tipo Histológico		
Carcinoma papilífero	41	75,9
Carcinoma folicular	13	24,1
Características histológicas		
Tumor maior que 4,0 cm no maior eixo (n=44)	19	43,2
Multifocalidade (n=42)	17	40,5
Desdiferenciação	5	9,3
Estádio pT inicial (n=46)		
pT1	6	13,0
pT2	2	4,3
pT3	18	39,1
pT4a	14	30,4
pT4b	6	13,0
Estádio pN inicial (n=46)		
pN0	18	50,0
pN1a	12	26,1
pN1b	16	23,9
Estádio M inicial		
M0	38	70,4
M1	16	29,6
Tratamento		
Tireoidectomia total	52	96,3
Esvaziamento cervical central	34	63,0
Esvaziamento cervical lateral (níveis II-V)	22	40,7
Ressecção R0	39	72,2
Múltiplas cirurgias	22	40,7
Radioiodoterapia	50	92,6
Metástases a distância		
Com o diagnóstico do tumor primário	16	29,6
Pulmão	54	100,0
Fígado	3	5,6
Osso	16	29,6
Múltiplos sítios	18	33,3
Seguimento		
Tireoglobulina estimulada positiva	50	92,6
Refratariedade ao iodo	34	63,0
Recidiva linfonodal	21	38,9
Segundo tumor primário (rim)	1	1,9
Progressão de doença pulmonar	37	68,5
Morte	13	24,1

A análise univariada mostrou que a desdiferenciação tumoral esteve associada com morte nesses pacientes. Além disso, demonstrou que a radioiodoterapia e a tireoglobulina estimulada positiva foram fatores associados com melhor prognóstico. Outros possíveis fatores associados com esse desfecho foram sexo, idade acima de 45 anos ao diagnóstico e recidiva linfonodal (Tabela 13).

Tabela 13. Análise univariada dos fatores associados com morte em pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide e metástases pulmonares.

VARIÁVEL	HR	IC95%	p*
Sexo masculino	2,559	0,816 – 8,031	0,107
Idade > 45 anos	2,871	0,632 – 13,044	0,172
Carcinoma folicular	0,585	0,127 – 2,683	0,490
Características Histológicas			
Tamanho > 4,0 cm	1,547	0,436 – 5,489	0,499
Multifocalidade	1,804	0,241 – 4,876	0,917
<i>Desdiferenciação</i>	<i>5,408</i>	<i>1,606 – 18,213</i>	<i>0,006</i>
Tumores T4	1,092	0,330 – 3,610	0,885
Metástase linfonodal ao diagnóstico	0,658	0,193 – 2,247	0,504
Tratamento			
Ressecção R0	0,262	0,033 – 2,089	0,206
Múltiplas cirurgias	0,549	0,157 – 1,920	0,348
<i>Radioiodoterapia</i>	<i>0,032</i>	<i>0,008 – 0,134</i>	<i><0,0001</i>
Dose de radioiodo > 600 mCi	0,605	0,148 – 2,471	0,484
Mais do que duas sessões de radioiodo	0,852	0,168 – 4,330	0,847
Seguimento			
<i>Tireoglobulina estimulada positiva</i>	<i>0,040</i>	<i>0,006 – 0,281</i>	<i>0,001</i>
Tireoglobulina estimulada > 5.000 ng/mL	2,405	0,720 – 8,033	0,154
Refratariedade ao radioiodo	0,449	0,121 – 1,666	0,231
Recidiva linfonodal	2,564	0,770 – 8,539	0,125
Metástase pulmonar ao diagnóstico	1,668	0,508 – 5,476	0,399
Múltiplos sítios de metástase	2,680	0,894 – 8,032	0,078
Progressão de doença	34,919	0,122 – 9964,735	0,218

* Regressão univariada de Cox

O sexo masculino (HR=4,21; IC95%: 1,06-16,78; p=0,042), idade acima de 45 anos (HR 10,9; IC95%: 1,14-103,85; p=0,38) e a

desdiferenciação tumoral (HR=31,61; IC95%: 4,81-207,48; $p<0,001$) foram identificados como fatores de risco independentes para morte nos pacientes com metástase pulmonar de CDT (regressão multivariada de Cox; Tabela 14). Quatro dos cinco pacientes que apresentaram desdiferenciação tumoral na sua evolução morreram (Figura 2). Esses pacientes não apresentaram nenhuma outra característica clínica em comum além da desdiferenciação, o que poderia levar a um possível viés de confusão (Tabela 15).

Tabela 14. Análise multivariada dos fatores preditivos de morte em pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide e metástases pulmonares.

VARIÁVEL	HR	IC95%	p*
Sexo masculino	4,210	1,056 – 16,783	0,042
Idade > 45 anos	10,904	1,145 – 103,853	0,038
Desdiferenciação	31,607	4,815 – 207,478	<0,0001
Tireoglobulina estimulada positiva	0,378	0,120 – 11,555	0,577
Recidiva linfonodal	0,511	0,097 – 2,701	0,429
Múltiplos sítios de metástases	2,119	0,562 – 7,992	0,267

* Regressão multivariada de Cox

Figura 2. Curvas de Kaplan-Meier demonstrando menor sobrevivência específica entre os pacientes com CDT e metástases pulmonares que apresentaram desdiferenciação tumoral durante o seguimento (20,0% vs. 46,1%; $p=0,003$ - teste de log-rank).

Tabela 15. Características clínicas dos cinco casos de pacientes com CDT com desdiferenciação na sua evolução.

Sexo/ idade	Tipo / estádio	Cirurgia R0	Recidiva/ persistência LND	TG estimu- lada	Refratari- idade ao iodo	M	Situação (meses)
Feminino 43 anos	CPT T2N1b	Não (pescoço)	Sim	+	Sim	Sim	Vivo (310)
Feminino 42 anos	CFT T1bN0	Sim	Sim	+	Sim	Sim	Morto (80)
Masculino 26 anos	CPT T4bN1b	Não (primário)	Não	-	Não realizada	Não	Morto (4)
Feminino 72 anos	CPT T3N1a	Sim	Sim	+	Não	Sim	Morto (30)
Masculino 49 anos	CPT T4bN1b	Não (primário)	Sim	-	Não realizada	Não	Morto (7)

Legenda: CPT= carcinoma papilífero de tireoide, CFT= carcinoma folicular de tireoide, LND= linfonodo, TG= tireoglobulina, M= presença de metástases além da pulmonar na evolução, + = positivo, - = negativo.

Além disso, também foi realizada uma análise de subgrupo exclusivamente com os pacientes com carcinoma papilífero (tipo histológico mais comum, embora sem significância estatística na análise univariada) e a desdiferenciação manteve-se como fator preditivo de morte nesses pacientes (Tabela 16).

Tabela 16. Análise multivariada dos fatores preditivos de morte em pacientes com carcinoma papilífero da tireoide e metástases pulmonares.

VARIÁVEL	HR	IC95%	p*
<i>Sexo masculino</i>	4,141	0,949-18,077	0,059
<i>Idade superior a 45 anos</i>	12,455	0,793-195,674	0,073
<i>Desdiferenciação</i>	21,083	2,977-149,287	0,002
Tireoglobulina estimulada positiva	0,177	0,006-5,626	0,326
Recidiva linfonodal	0,491	0,096-2,505	0,392
Múltiplos sítios de metástases	2,429	0,619-9,536	0,203

* Regressão multivariada de Cox

5.2. DADOS DESCRITIVOS DOS PACIENTES QUE MORRERAM DE CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE

Foram identificados 33 pacientes tratados no ICESP que morreram devido ao carcinoma diferenciado de tireoide entre maio de 2009 e dezembro de 2015. O tipo histológico mais comum foi o carcinoma papilífero, responsável por 66,7% dos casos, enquanto o carcinoma folicular foi diagnosticado em 30% dos pacientes e houve um caso de carcinoma diferenciado não especificado. A média de idade no diagnóstico foi de $58,2 \pm 12$ anos, o tamanho médio da neoplasia foi $4,7 \pm 3,4$ cm (tamanho mínimo de 0,5 cm e máximo de 13,5 cm) e a multifocalidade estava presente em 50% dos casos. Os dados descritivos dessa casuística encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17. Dados descritivos dos pacientes que morreram por carcinoma diferenciado da tireoide no ICESP de janeiro 2009 a dezembro de 2016 (n=33).

Variável	N (%)
Idade	
≥ 45 anos	31 (94,0)
< 45 anos	2 (6,0)
Média ± Desvio-Padrão (anos)	58.2 ± 12,0
Sexo	
Masculino	12 (36,4)
Feminino	21 (63,6)
Tipo histológico	
Papilífero	22 (66,7)
Folicular	10 (30,3)
Estádio T	
T1	4 (15,4)
T2	2 (7,7)
T3	10 (38,4)
T4a	5 (19,2)
T4b	5 (19,2)
Estádio N	
N0	11 (44,0)
N1a	5 (20,0)
N1b	9 (36,0)
Multifocalidade	
Sim	9 (50,0)
Não	9 (50,0)

Trinta e um pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico inicialmente, apenas dois não o foram por serem consideradas lesões irresssecáveis. Treze pacientes foram submetidos a tireoidectomia total, oito a tireoidectomia total e esvaziamento cervical do compartimento central, outros oito a tireoidectomia total com esvaziamento cervical dos compartimentos central e lateral e dois casos de tireoidectomias parciais inicialmente, totalizadas em um segundo momento.

A maioria dos pacientes (22 casos; 66,7%) foram tratados com radioiodoterapia em algum momento, com uma dose média de $499,4 \pm 264,8$ mCi (dose mínima de 50 mCi e máxima de 1.200 mCi). Doze pacientes foram considerados não responsivos a iodo no decorrer do tratamento. A

tireoglobulina estimulada média foi 19.755 ± 5.850 ng/mL e somente um caso teve tireoglobulina negativa durante o acompanhamento.

Dezesseis pacientes apresentaram recidiva linfonodal e quatorze desses foram submetidos a tratamento cirúrgico de resgate.

Todos os pacientes, exceto um, apresentavam metástases a distância, 32 casos. Destes, 42,4% dos casos foram diagnosticados em conjunto com o diagnóstico da neoplasia primária. O local mais comumente acometido por metástases foi o pulmão, em 69,7% dos pacientes, seguido de osso, em 66,7%. Dois paciente tinham metástases no fígado e dois no rim, mas todos esses também tinham doença pulmonar. Ainda, 42% dos casos tinham metástase em mais de um sítio.

Somente oito pacientes não receberam nenhum tratamento específico para as metástases e suas complicações, sendo que dez foram tratados cirurgicamente; seis receberam sorafenibe (inibidor de tirosina-quinase) como parte de um protocolo de pesquisa, onze receberam radioterapia e seis quimioterapia sistêmica.

Ao analisar-se a causa específica que levou esses pacientes ao óbito, verificou-se que a principal causa foi a morte por insuficiência respiratória em decorrência das metástases pulmonares e suas complicações (17 pacientes, 51,5%). Outras causas foram complicações pós-operatórias em cinco casos, progressão de doença em sistema nervoso central em três casos e progressão de doença local com invasão de via aérea em apenas um caso. Sete pacientes morreram de causas diversas. A Figura 3 ilustra um exemplo de doença pulmonar metastática que levou à morte de um paciente da casuística.

Figura 3. Imagens tomográficas de tórax (A) e abdome (B) de paciente com carcinoma folicular de tireoide pT1a de 5 mm que morreu por obstrução de brônquio fonte esquerdo devido a compressão metastática.

O tempo médio entre o diagnóstico e a morte foi de 74,1 meses (mediana de 49 meses, mínimo de 4 e máximo de 279 meses). A mediana de sobrevivência entre o diagnóstico da doença e a primeira evidência de metástases foi alcançada em 9 meses (IC 95%: 0-20,9 meses), entre o diagnóstico e a progressão de doença em 21 meses (IC 95%: 9,9-32,1 meses), entre o diagnóstico e a morte em 49 meses (IC 95%: 36,8-61,2 meses) e entre o diagnóstico da metástase e a morte em 31 meses (IC 95%: 14,2-29,8 meses). Essas análises de sobrevivência estão ilustradas na Figura 4.

Figura 4. Curvas de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada entre o diagnóstico e a doença metastática (A), entre o diagnóstico e a progressão de doença (B), entre o diagnóstico e a morte (C) e entre o diagnóstico da metástase e a morte (D) na evolução dos pacientes que morreram por carcinoma diferenciado da tireoide.

Ao analisar-se a relação entre a progressão de doença e a morte, verificou-se que a mediana de sobrevivência foi alcançada em apenas 22 meses, ou seja, após 22 meses da progressão de doença metade dos pacientes havia morrido (Figura 5).

Figura 5. Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada entre a progressão de doença e o óbito.

5.3. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DOS GENES *BRAF*, *RAS* E *TERT*

Após a seleção do material parafinado do tumor primário dos casos que morreram por progressão de doença, obteve-se material para análise de 15 casos.

Verificou-se a presença da mutação do gene *BRAF* em três de dez pacientes com carcinoma papilífero, o que representa 30%. Não se observou nenhum caso de *RAS* mutado entre os casos de carcinoma folicular. Já na análise da mutação do gene *TERT* foram observadas mutações em três de dez casos avaliados, dois casos em carcinomas papilíferos e um caso em um carcinoma folicular. Apenas um caso apresentou mutação simultânea de dois genes, *BRAF* e *TERT* (caso 1; carcinoma papilífero). Os resultados das análises das mutações em todos os casos estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18. Dados descritivos das análises das mutações *BRAF*^{V600E}, *RAS* e *TERT* encontradas no grupo de pacientes com CDT que morreram por progressão de doença.

Caso	Tipo Histológico	<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>TERT</i>
1	CPT	T1799A	-	-	-	-	C228T
2	CPT	T1799A	-	-	-	-	NA
3	CPT	WT	-	-	-	-	C228T
4	CPT	T1799A	-	-	-	-	WT
5	SOE	WT	-	-	-	-	NA
6	CPT	WT	-	-	-	-	NA
7	CPT	WT	-	-	-	-	WT
8	CPT	WT	-	-	-	-	NA
9	CPT	WT	-	-	-	-	WT
10	CPT	WT	-	-	-	-	WT
11	CPT	WT	-	-	-	-	WT
12	CFT	-	WT	WT	WT	WT	NA
13	CFT	-	WT	WT	WT	WT	WT
14	CFT	-	WT	WT	WT	WT	WT
15	CFT	-	WT	WT	WT	WT	C228T

Legenda: CPT: carcinoma papilífero; SOE: sem origem específica; CFT: carcinoma folicular; T1799A: mutação pontual do gene *BRAF*; WT: *wild type* (fenótipo selvagem); C228T: mutação pontual do gene *TERT*; NA: não avaliável por questões técnicas; -: teste não realizado.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O manejo terapêutico dos CDT está passando por um período de revisão que nos traz muitos desafios. Há uma tendência mundial a sermos menos agressivos em nossas condutas devido à baixa agressividade da doença e à baixíssima mortalidade. No entanto, ainda temos poucos dados que nos forneçam informação, de forma precisa, sobre quais pacientes apresentarão evolução favorável e quais terão desfechos ruins com metástases e óbito pela doença.

Devido a esse contexto, estudos desse gênero se revestem de suma importância. Análises detalhadas dos fatores relacionados a mortalidade podem trazer informações valiosas sobre quais pacientes podemos tratar de forma mais conservadora e quais devemos destacar por apresentarem maior risco de seguir uma pior evolução.

Na casuística aqui apresentada, evidenciamos a presença de metástases pulmonares em 54 pacientes no universo de 1.114 pacientes operados por CDT no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) entre maio 2009 e dezembro de 2015, perfazendo uma taxa de 4,8%. Tais dados estão em linha com outras séries da literatura. Chopra *et al.*¹⁰ descreveram 200 casos com metástases pulmonares em 4.370 pacientes com CDT (4,6%) enquanto Hirsch *et al.*¹³⁵ identificaram 138 casos com metástase pulmonar em 2.018 pacientes tratados em um período de 44 anos (6,8%).

Ainda, Massin *et al.*¹⁸⁴ identificaram a presença de metástases pulmonares em 10% de casos de carcinoma folicular e 5% dos casos de carcinoma papilífero.

A mortalidade e fatores relacionados ao óbito entre esses pacientes são dados pouco explorados na literatura, o que reforça a importância deste estudo. Análises aprofundadas são limitadas pela heterogeneidade dos relatos, com variações nos critérios de inclusão relacionados ao tipo histológico, momento do diagnóstico da metástase, presença de metástases em múltiplos sítios, entre outros, limitando a aplicabilidade das informações.

Na nossa casuística, verificamos uma mortalidade de 24,1% entre os pacientes metastáticos, com o sexo masculino, idade acima de 45 anos e desdiferenciação do tumor como fatores de risco independentes para esse desfecho. Tal mortalidade é semelhante a apresentada por Hirsch *et al.*¹³⁵, mas outras casuísticas descrevem mortalidade de até 46%^{92, 135, 185}.

Sohn *et al.*¹³⁶ relataram entre 89 pacientes com metástases pulmonares exclusivas uma sobrevivência em 5 e 10 anos de 78% e 73%, respectivamente. Demonstraram ainda a refratariedade à iodoterapia como fator de risco independente para o óbito nesses casos.

A idade é um dos fatores mais comumente associados a maior mortalidade nos casos de CDT. Tal dado fica evidente pela sua presença como fator determinante na classificação da AJCC⁸⁷, preditor de mortalidade. Nos estudos específicos sobre pacientes com metástases a distância, a idade também aparece como um dos fatores mais constantemente associados a maior mortalidade, assim como nos dados aqui apresentados.

Em uma análise retrospectiva de 52 pacientes com metástases a

distância diagnosticadas até seis meses do tumor primário, Nixon *et al.*⁹² identificaram a idade acima de 45 anos, tipo histológico folicular e a presença de metástases extra-pulmonares como fatores associados a uma menor sobrevivência específica na análise univariada. No entanto, tais achados não se confirmaram na análise multivariada, limitando a importância desses dados. Os autores descrevem ainda uma associação entre a idade acima de 45 anos e maiores taxas de refratariedade ao iodo, o que pode ser interpretado como uma menor diferenciação desses tumores, e estar relacionado a um pior prognóstico geral nesses pacientes.

Em outro estudo retrospectivo com 138 pacientes com metástases a distância, os fatores associados a maior mortalidade foram, além da idade acima de 45 anos, a presença de extensão extra-tireoideana do tumor primário, a refratariedade ao iodo e a presença de metástases em mais de um sítio¹³⁵. No entanto, este estudo inclui também neoplasias de origem folicular pouco diferenciadas, o que é um fator de confusão por apresentarem comportamento sabidamente mais agressivo.

Outros dois estudos retrospectivos demonstraram a idade como fator preditivo de pior prognóstico. Ronga *et al.*¹² identificaram um risco de morte aumentado em 5,4 vezes em pacientes acima de 45 anos e uma redução no risco em 1/6 nos casos tratados com iodo, entre 96 pacientes metastáticos. Já Showalter *et al.*¹³⁸, entre 40 pacientes que apresentaram metástases a distância ao diagnóstico do tumor primário, relataram a idade como único fator independente relacionado a sobrevivência específica, com nenhum paciente abaixo dos 40 anos tendo morrido pela doença na evolução.

Em uma publicação coreana recente, os autores analisaram fatores de

pior prognóstico em pacientes com metástases exclusivamente pulmonares e identificaram a idade acima de 55 anos como fator associado a progressão de doença, mas não a sobrevivência doença específica. O único fator independente relacionado a mortalidade foi a refratariedade ao iodo¹³⁶.

Alguns autores descreveram a presença de metástases em outros sítios extrapulmonares como fator de pior prognóstico. Tal achado não foi confirmado na nossa casuística, na qual a presença de metástases extrapulmonares não impactou no prognóstico de forma significativa. Sabra *et al.*¹⁸⁵ relataram uma sobrevivência global e livre de doença melhores em pacientes com doença restrita ao pulmão (11,24 anos e 4,43 anos, respectivamente) *versus* metástases pulmonares e ósseas (6,01 anos e 1,67 anos, respectivamente). Hirsch *et al.*¹³⁵ também demonstraram a presença de metástase em mais de um sítio como fator associado a maior mortalidade. No entanto, ambas as casuísticas incluem tumores pouco diferenciados, o que é um fator que dificulta a comparação. Tais achados podem, eventualmente, ser explicados pelo fato de metástases ósseas, que ocupam a segunda posição como mais frequentes, terem uma pior resposta à iodoterapia e maior associação com o tipo histológico folicular, mas na nossa casuística não verificamos nenhuma das duas associações.

O sexo masculino como fator de pior prognóstico no CDT é descrito por muitos autores^{109, 110, 186}, mas não há um consenso. Muitas séries não demonstram essa relação^{101, 105, 106}. Entre as séries de fatores prognósticos em pacientes metastáticos também não se trata de um consenso. Em um estudo específico de mortalidade entre 74 pacientes com metástases pulmonares refratárias ao iodo, Ito *et al.*¹⁸⁷ descreveram que o sexo masculino

foi associado com maior mortalidade. Na nossa casuística, o sexo masculino foi fator independente de risco para morte, com um risco 4,2 vezes maior do que entre as pacientes do sexo feminino. No entanto, outros autores não descrevem tal associação nos pacientes metastáticos^{92, 135, 136}.

Metástases refratárias, ou não ávidas por iodo, são relatadas por diversos autores como fator de pior prognóstico. Ronga *et al.*¹² descreveram, entre 96 pacientes com metástases pulmonares exclusivas, que o tratamento com iodo diminuiu o risco de morte em 16,6%. Na casuística de Sohn *et al.*¹³⁶ também foi demonstrada uma associação entre a refratariedade ao iodo e uma maior mortalidade, com uma sobrevivência específica em 10 anos de 55% nos casos refratários e 93% nos pacientes com metástases ávidas por iodo.

Em um estudo coreano com 164 pacientes com doença metastática pulmonar a sobrevivência em 10 e 20 anos foi de 85% e 71%, respectivamente. Os autores descrevem a idade, tipo histológico folicular, o momento do diagnóstico das metástases, a localização das metástases e o tamanho das metástases como fatores que poderiam predizer pior prognóstico, mas o único fator independente relacionado ao pior prognóstico (progressão de doença ou morte) foi a refratariedade ao iodo¹⁵. Em um outro estudo apenas com pacientes com metástases refratárias ao iodo, Ito *et al.*¹⁸⁷ demonstraram que a idade acima de 60 anos e o sexo masculino foram os únicos fatores independentes preditores de morte, de maneira semelhante aos nossos resultados.

Na casuística discutida neste estudo, analisamos a refratariedade ao iodo conforme a definição da ATA 2015, ou seja, não só a capacidade de o

tecido captar ou não o iodo⁴². Tal dado não foi associado a uma maior mortalidade entre os pacientes aqui descritos. No entanto, a perda da capacidade de concentrar iodo em um tecido metastático de origem tireoidiana pode ser interpretada como uma fase do processo de dediferenciação tumoral, achado mais significativamente associado com a mortalidade neste estudo.

A dediferenciação tumoral, comprovada em espécimes patológicos, é um dado muito pouco explorado na literatura e pode ocorrer em até 5% dos casos de CDT¹³⁹. Na nossa casuística, identificamos a presença de tecido metastático dediferenciado (morfologia de alto grau com perda das características histológicas iniciais) em biópsias ou peças cirúrgicas de metástases a distância ou linfonodais como o fator mais fortemente associado com a mortalidade. A sobrevivência específica foi de 20% nos pacientes com dediferenciação *versus* 46% sem tal apresentação, independentemente de qualquer outro fator associado. Essa mudança das características histológicas das metástases garantem um crescimento mais agressivo, maior potencial de disseminação e uma perda da capacidade de concentrar iodo, fatores que tornam as lesões mais resistentes às terapêuticas habituais¹³⁹.

Alguns estudos recentes relacionam o fato de haver metástases pulmonares com captação ao PET com um pior prognóstico. Tal associação está baseada no conceito de que a alta atividade metabólica demonstrada pela captação no PET acontece em um tumor mais indiferenciado que não apresenta captação à PCI. Robbins *et al.*¹³⁴ demonstraram em uma coorte de 907 pacientes que os casos metastáticos com PET positivo apresentaram risco de morte 7,28 vezes maior que os com PET negativo. Tal associação

não foi explorada na nossa casuística. No entanto, acreditamos que poderia acrescentar informações importantes no contexto da desdiferenciação, o que será investigado por nós em estudos futuros.

Na tentativa de entender melhor os casos que apresentam prognóstico desfavorável e, principalmente, elucidar tanto quanto possível a mortalidade pela doença, fizemos uma análise detalhada do perfil dos pacientes que morreram por CDT na instituição. Para tal análise, foi feita uma busca ativa entre todos os casos com CDT avançado para identificação do maior número de óbitos possível. Incluímos todos os pacientes que foram tratados na instituição, não necessariamente tendo sido lá operados.

Dados na literatura sobre óbito específico por CDT são escassos, principalmente pela raridade do evento. São basicamente séries de casos, com números pequenos ao longo de um período grande de tempo, muitas vezes acima de 20 anos. Devemos levar isso em conta ao analisarmos tais dados, pois, dentro de uma mesma casuística, observam-se grandes mudanças de manejo dos casos ao longo do tempo.

Entre os nossos 33 casos de morte por progressão de doença, verificamos que a idade novamente foi um fator de relevante importância. Apenas dois casos tinham idade abaixo de 45 anos (6%), com uma média de idade de 58,2 anos. Tais dados são semelhantes aos obtidos em outras casuísticas. Kitamura *et al.*¹⁰⁰ descreveram entre óbitos por CDT uma média de idade de 58 anos, assim como Smith *et al.*¹⁴¹ constataram uma média de 59 anos entre 56 casos tratados na *Mayo Clinic*. Em um artigo publicado com a casuística de óbitos por CDT do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, os autores mostraram uma média de idade de 65 anos entre os que morreram

e 46 anos entre os vivos, evidenciando um perfil de idade muito diferente entre os dois grupos. Wu *et al.*⁹⁷ mostraram também que a idade acima de 45 anos está associada a maior mortalidade, mas, além disso, indicaram também que esses pacientes morrem em um intervalo mais curto de tempo.

No entanto, um paciente da nossa casuística chama a atenção por fugir desse padrão. Trata-se de um homem de 26 anos com carcinoma papilífero com primário volumoso e metástases pulmonares de crescimento rápido, que morreu após quatro meses do diagnóstico histológico. Este foi um dos casos com desdiferenciação presente nas metástases e evolução extremamente desfavorável. Tais casos representam um dos nossos maiores desafios e ainda não são totalmente compreendidos.

De acordo com o classicamente esperado, a maior parte dos casos apresentava tumores iniciais extensos, com 76,8% dos pacientes classificados como T3 e T4 e 56% com linfonodos positivos. No entanto, tivemos quatro casos (15,4%) de tumores T1 e 44% de casos N0. Tais achados estão de acordo com outros dados da literatura, porém com grandes variações. Nixon *et al.*¹⁴ relataram 18% de casos T1 e Beasley *et al.*¹³ descreveram três em dez casos de morte com tumores menores de 2 cm. Já em uma série da Nova Zelândia, os autores descrevem apenas um paciente classificado como T1 em 25 mortes¹⁸⁸ e Kitamura *et al.*¹⁰⁰ tem apenas 4% de casos com essa classificação em 99 óbitos por CDT. Esses fatos demonstram como essa associação não é sempre encontrada e tão bem conhecida.

Conforme já demonstrado na literatura, um dos principais fatores associados com maior mortalidade entre os casos de CDT é a presença de metástases a distância. Na série aqui descrita, verificamos que apenas um

paciente que morreu por CDT não apresentava metástase a distância. O sítio mais comum das metástases foi o pulmão, seguido pelos ossos, achados também condizentes com a literatura^{14, 96, 97}.

A análise das causas específicas de morte entre esses pacientes traz dados muito interessantes. Nas séries de casos mais recentes, próximas à virada dos anos 2000, a principal causa de morte está relacionada às metástases a distância, principalmente a insuficiência respiratória devido a progressão das lesões pulmonares. No entanto, o cenário não foi sempre esse.

Os primeiros relatos sobre esse assunto na literatura são dos anos 1960 e mostram a progressão de doença local com invasão de via aérea como uma das principais causas de morte. Tollefsen *et al.*¹⁴⁰ em 1964 descreveram 40% de mortes por progressão de doença local e 52% por causas relacionadas as metástases. De forma semelhante, um trabalho da *Mayo Clinic* de 1988 relata 36% de óbito por progressão local e 37% por progressão de metástases pulmonares¹⁴¹.

Nas séries mais recentes, identifica-se um perfil mais semelhante ao descrito na nossa casuística. Em 2001, Beasley *et al.*¹³ mostraram 70% de mortes relacionadas a metástases e 20% por progressão local. Já no relato de Nixon *et al.*¹⁴, entre os 17 casos de morte por CDT, 88% foram relacionadas a metástases e outros dois casos de pneumonia aspirativa que poderiam estar relacionados a complicações de doença local. Na série aqui descrita, tivemos 85,3% das causas de morte relacionadas a metástases a distância e apenas um caso de morte por progressão local e invasão de via aérea.

Tal mudança nas causas de óbito nesses pacientes podem estar relacionadas a uma mudança na abordagem terapêutica dos CDT nas últimas décadas. Cada vez mais são propostas abordagens locais mais agressivas para remover toda doença macroscópica, com ressecções algumas vezes ampliadas para outros órgãos, associada a uma maior disponibilidade e disseminação do uso da iodoterapia e eventual radioterapia externa.

Poucos estudos fazem uma análise específica do tempo entre o diagnóstico e a morte nesses casos. Em um estudo italiano, Ronga *et al.*¹⁸⁹ avaliaram uma casuística de 83 mortes por CDT. Mostraram um tempo médio entre o diagnóstico e a morte de 6,5 anos (variando de 0,2 a 24 anos, com mediana de 5 anos) e que a idade no diagnóstico tem relação inversamente proporcional ao tempo entre o diagnóstico e a morte. Outra série descritiva com 102 casos fez a análise de tempo entre o diagnóstico e a morte separando os tipos histológicos papilífero e folicular. Os autores verificaram que esses intervalos foram maiores nos carcinomas papilíferos, com uma média de 11 anos, quando comparados a um intervalo médio de 6 anos nos pacientes com carcinomas foliculares⁹⁷.

Na nossa casuística encontramos dados semelhantes aos de Ronga *et al.*¹⁸⁹, com uma média do intervalo entre o diagnóstico e a morte de 5,9 anos (variando de 0,3 a 23 anos, com mediana de 4 anos). No entanto, o que chama mais atenção é o fato de que, a partir do momento em que os pacientes apresentaram progressão de doença, esta foi muito rápida, com uma mediana de sobrevivência de apenas 1,8 anos (IC 95%: 1,2-2,5).

Conforme discutido anteriormente, há muita divergência na literatura quanto aos fatores clínicos que são associados com pior prognóstico entre os

paciente com CDT, principalmente os relacionados de maneira específica com a mortalidade. Os sistemas de estratificação de risco atuais são baseados em fatores clínicos e patológicos demasiadamente comuns para diferenciar com acurácia os pacientes de alto risco para morte, especialmente em uma doença com taxas de desfecho muito baixas^{42, 87}. Por isso, abordagens baseadas no âmbito molecular são um campo promissor nos CDT há alguns anos, mas a receita da transição da promessa para a aplicabilidade real ainda não foi bem estabelecida e é foco de muitos estudos.

Nesse cenário, o papel da mutação *BRAF V600E* é amplamente estudado, principalmente entre os carcinomas papilíferos. Estudos expressivos multicêntricos mostraram sua associação com recidiva^{190, 191} e mortalidade¹⁵⁵. No entanto, devido a sua alta prevalência, não é possível indicar tratamentos mais agressivos com base apenas nesse dado. Estudos mais recentes descrevem que o gene *TERT* (suas mutações C228T e C250T) apresenta associação maior com agressividade e mortalidade nos CDT^{173, 175}. No entanto, muito mais do que a contribuição de cada mutação isolada, foi descoberta uma forte associação do dueto *BRAF* e *TERT* com pior prognóstico^{177, 178}. A associação do dueto *RAS* e *TERT* nos carcinomas foliculares é menos explorada na literatura, mas também é descrita como de pior prognóstico^{192, 193}.

Nesse contexto, na tentativa de entender melhor nossa casuística de pacientes que morreram por CDT, optamos por complementar a análise descritiva dos casos com uma análise das mutações desses genes nos tumores primários, com o propósito de avaliar se eles apresentavam uma taxa maior de mutações do que os CDT em geral. Devido a questões logísticas das

instituições e ao fato de o ICESP receber muitos casos referenciados em que a cirurgia inicial foi feita em outro serviço, conseguimos material do tumor primário de apenas 15 pacientes para análise.

Na nossa casuística, encontramos a mutação *BRAF V600E* em três casos, entre os dez casos de carcinoma papilífero, correspondendo a 30%. A prevalência da mutação *BRAF* na literatura é extremamente variável, sendo relatada em até 85% dos CPT^{146, 148, 149}, mas a média dos relatos ocorre em torno de 40%^{150, 151, 157}. Ao analisarmos dados brasileiros, que são mais restritos, também vemos uma variabilidade significativa. Da Silva *et al.*¹⁹⁴ descreveram uma prevalência de 63,5% entre 116 CPT em um hospital de Goiás, enquanto Dutenhfner *et al.*¹⁹⁵ relatam, em um estudo realizado na mesma instituição da investigação aqui apresentada, uma prevalência de *BRAF* mutado de 29%, semelhante à encontrada na nossa casuística.

Devido à associação relatada da mutação *BRAF* com pior prognóstico, poderíamos esperar uma prevalência maior dessa alteração em uma casuística de casos sabidamente agressivos e com morte pela doença. No entanto, isso não ocorreu. Encontramos uma frequência semelhante à única outra série da mesma instituição, já mencionada no parágrafo anterior, entre 51 pacientes submetidos a tireoidectomia por carcinoma papilífero independentemente do estágio¹⁹⁵. O mesmo estudo também não encontrou associação da mutação com presença de metástases linfonodais ocultas.

A ausência de uma maior frequência de *BRAF* mutado entre pacientes mortos pela doença sugere que essa não é uma forma de triagem confiável para selecionar os pacientes com pior prognóstico e que ainda há muito que não é totalmente compreendido referente a essa mutação, principalmente nos

casos de pacientes que morreram pela doença.

Não encontramos nenhum caso de mutação *RAS* entre os casos de carcinoma folicular. No entanto, o fato de a nossa casuística apresentar somente quatro casos de carcinoma folicular limita muito a interpretação desses dados.

Em relação ao *TERT*, verificamos a presença de sua mutação em três casos, dois carcinomas papilíferos e um folicular. Entretanto, vale a ressalva de que por dificuldade técnicas com as amostras, só conseguimos fazer a análise em dez dos quinze casos. De todo modo, verificamos o *TERT* mutado em 30% dos casos analisados, uma prevalência mais alta do que as encontradas na maioria dos estudos, que ficam em torno de 10%^{160, 173, 193, 196}. Desses três casos, dois apresentaram desdiferenciação na sua evolução.

Nós encontramos apenas um paciente com associação de mutações, no caso uma envolvendo *BRAF* e *TERT* em um carcinoma papilífero T3N1bM1, com metástases ósseas e desdiferenciação tumoral. Em nossa pequena amostra isso seria correspondente a 10%, que é maior do que o relatado em muitos estudos, que descrevem em torno de 5%^{173, 193}. No entanto, pela casuística pequena não podemos extrair relevância estatística dessa observação.

O único outro estudo na literatura que analisa alterações genéticas em pacientes mortos por CDT foi publicado pela equipe do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* em 2017. Nessa análise, os autores fazem uma comparação entre as mutações no grupo de mortos por carcinoma de tireoide não anaplásico (35 pouco diferenciados e 22 bem diferenciados) e dados de bancos de dados do *Cancer Genome Atlas Study* (TCGA)¹⁶⁰. Encontraram,

de forma semelhante ao nosso estudo, uma menor prevalência de mutações *BRAF* entre os pacientes que morreram por carcinomas não anaplásicos, na comparação com o controle representado pelo TCGA (40% e 62%, respectivamente). Tal diferença não é explorada na publicação; no entanto, os autores encontraram uma taxa alta de mutações do *TERT* (60%) muito maior do que os 9% relatados pela TCGA e os nossos 30%. Foi a mutação mais frequente nessa casuística, comparável à encontrada entre os carcinomas anaplásicos (73%). Houve ainda uma associação com as mutações *BRAF* e *RAS*, aumentando o impacto negativo sobre o prognóstico do *TERT*.

Estudos discutem o papel do *TERT* na desdiferenciação tumoral de CDT, devido a sua alta prevalência em tumores pouco diferenciados ou indiferenciados. Liu *et al.*¹⁷³ descreveram, em um dos primeiros estudos associando a mutação *TERT* com carcinomas da tireoide, uma prevalência da mutação do *TERT* em 12,2% dos CDT, 37,5% entre os pouco diferenciados, 46,3% entre os carcinomas anaplásicos; além disso, não foi encontrada a mutação em nenhum caso de nódulos benignos. Tais dados sugerem que a mutação é específica da malignidade e possivelmente um evento mais tardio na gênese tumoral, relacionado à desdiferenciação tumoral dos CDT. Entre os nossos casos, encontramos o *TERT* mutado em 30% dos casos analisados, o que é uma prevalência maior do que a média dos CDT. Além disso, dois desses três casos apresentaram desdiferenciação tumoral na sua evolução, o que corrobora essa hipótese da relação entre o *TERT* e a desdiferenciação.

Este estudo apresenta algumas limitações. Inicialmente, seu desenho

retrospectivo implica dados mais limitados e ausência de controle sobre a condução dos casos. No entanto, no estudo da mortalidade por CDT, tal limitação é difícil de superar, pois, pela baixíssima mortalidade e curso longo da doença, seria necessário estudo muito longo com número muito grande de pacientes para obter, mesmo assim, um número ainda pequeno de óbitos. Além disso, o perfil da instituição, o de receber muitos pacientes referenciados tratados inicialmente em outros locais, também contribuiu para a heterogeneidade da condução dos casos e uma limitação para obter alguns dados, assim como o acesso a material tumoral para análise molecular.

O número pequeno de pacientes de que obtivemos material para análise genética também foi, conseqüentemente, um limitante. Conseguimos descrever em maior detalhe a nossa casuística e conhecer melhor nossos pacientes falecidos da doença, mas não extrair dados com significância estatística.

Entre as perspectivas abertas por essa linha de pesquisa figuram a tentativa de ampliação da análise genética e molecular para um número maior de pacientes com desfecho de óbito e a criação de um grupo controle para comparação com pacientes de melhor prognóstico. Além disso, o estudo da associação das captações das metástases no PET com a desdiferenciação e mortalidade nos pacientes metastáticos por CDT também se apresenta como uma estratégia promissora de investigação.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os objetivos inicialmente propostos para este estudo foram alcançados.

Identificamos, entre os carcinomas diferenciados de tireoide metastáticos para pulmão, que a idade acima de 45 anos, o sexo masculino e principalmente a desdiferenciação tumoral são fatores de risco independentes para morte pela doença.

Descrevemos o grupo de pacientes que morreu de progressão de CDT e verificamos que a maior parte das mortes está relacionada com progressão de doença metastática. A idade mostrou-se novamente um fator importante, com apenas dois casos de óbito abaixo dos 45 anos.

Nesse grupo, encontramos uma prevalência de mutações *BRAF* semelhante à descrita nos paciente com CDT em geral, na mesma instituição. Por outro lado, encontramos 30% de mutações no gene *TERT*, valor acima da média, reforçando seu papel nos CDT de pior prognóstico. Não encontramos a mutação *RAS* em nenhum dos pacientes com carcinoma folicular.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/07/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 176/15 intitulado: “ANÁLISE CLÍNICA E MOLECULAR DE FATORES RELACIONADAS AO ÓBITO DE PACIENTES COM CARCINOMA DIFERENCIADO DA GLÂNDULA TIREOIDE” apresentado pelo Departamento de CIRURGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Leandro Luongo de Matos

Pesquisador (a) Executante: Ana Kober Nogueira Leite

CEP-FMUSP, 15 de Julho de 2015.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cancer facts & figures 2019 [Internet]. American Cancer Society Inc. 2019.
2. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/ INCA (Instituto Nacional do Câncer) [Internet]. 2018.
3. Leenhardt L, Bernier MO, Boin-Pineau MH, Conte Devolx B, Marechaud R, Niccoli-Sire P, et al. Advances in diagnostic practices affect thyroid cancer incidence in France. *Eur J Endocrinol*. 2004;150(2):133-9.
4. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1351-61.
5. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006;295(18):2164-7.
6. Morris LG, Sikora AG, Tosteson TD, Davies L. The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid*. 2013;23(7):885-91.
7. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA*. 2017;317(13):1338-48.
8. Shoup M, Stojadinovic A, Nissan A, Ghossein RA, Freedman S, Brennan MF, et al. Prognostic indicators of outcomes in patients with distant metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Am Coll Surg*. 2003;197(2):191-7.
9. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comments]. *Cancer*. 1998;83(12):2638-48.
10. Chopra S, Garg A, Ballal S, Bal CS. Lung metastases from differentiated thyroid carcinoma: prognostic factors related to remission and disease-free survival. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(3):445-52.

11. 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.
12. Ronga G, Filesi M, Montesano T, Di Nicola AD, Pace C, Travascio L, et al. Lung metastases from differentiated thyroid carcinoma. A 40 years' experience. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;48(1):12-9.
13. Beasley NJ, Walfish PG, Witterick I, Freeman JL. Cause of death in patients with well-differentiated thyroid carcinoma. *Laryngoscope*. 2001;111(6):989-91.
14. Nixon IJ, Ganly I, Palmer FL, Whitcher MM, Patel SG, Tuttle RM, et al. Disease-related death in patients who were considered free of macroscopic disease after initial treatment of well-differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2011;21(5):501-4.
15. Cho SW, Choi HS, Yeom GJ, Lim JA, Moon JH, Park DJ, et al. Long-term prognosis of differentiated thyroid cancer with lung metastasis in Korea and its prognostic factors. *Thyroid*. 2014;24(2):277-86.
16. 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.
17. 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 7-8.
18. Lin JD, Hsueh C, Chao TC. Early recurrence of papillary and follicular thyroid carcinoma predicts a worse outcome. *Thyroid*. 2009;19(10):1053-9.
19. Sancho JJ, Lennard TW, Paunovic I, Triponez F, Sitges-Serra A. Prophylactic central neck dissection in papillary thyroid cancer: a consensus report of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). *Langenbecks Arch Surg*. 2014;399(2):155-63.
20. 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 100-1.

21. LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol*. 2011;24 Suppl 2:S1-9.
22. Aschebrook-Kilfoy B, Grogan RH, Ward MH, Kaplan E, Devesa SS. Follicular thyroid cancer incidence patterns in the United States, 1980-2009. *Thyroid*. 2013;23(8):1015-21.
23. Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2892-9.
24. Iftikhar H, Ikram M, Muhammad AY, Nathani KR. Unusual Presentation of Differentiated Thyroid Cancer Metastasis. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2018;22(2):167-70.
25. Bose S, Walts AE. Thyroid fine needle aspirate: a post-Bethesda update. *Adv Anat Pathol*. 2012;19(3):160-9.
26. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro AP, Vaisman M. [Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(4):503-9.
27. Davies L, Morris LG, Haymart M, Chen AY, Goldenberg D, Morris J, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: The Increasing Incidence of Thyroid Cancer. *Endocr Pract*. 2015;21(6):686-96.
28. Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(11):646-53.
29. Elaraj DM, Sturgeon C. Adequate surgery for papillary thyroid cancer. *Surgeon*. 2009;7(5):286-9.
30. Hughes DT, Haymart MR, Miller BS, Gauger PG, Doherty GM. The most commonly occurring papillary thyroid cancer in the United States is now a microcarcinoma in a patient older than 45 years. *Thyroid*. 2011;21(3):231-6.
31. Eng CY, Quraishi MS, Bradley PJ. Management of Thyroid nodules in adult patients. *Head Neck Oncol*. 2010;2:11.

32. Watkinson JC, British Thyroid A. The British Thyroid Association guidelines for the management of thyroid cancer in adults. *Nucl Med Commun*. 2004;25(9):897-900.
33. Bessey LJ, Lai NB, Coorough NE, Chen H, Sippel RS. The incidence of thyroid cancer by fine needle aspiration varies by age and gender. *J Surg Res*. 2013;184(2):761-5.
34. Lansford CD, Teknos TN. Evaluation of the thyroid nodule. *Cancer Control*. 2006;13(2):89-98.
35. Sakorafas GH, Peros G, Farley DR. Thyroid nodules: does the suspicion for malignancy really justify the increased thyroidectomy rates? *Surg Oncol*. 2006;15(1):43-55.
36. Walsh RM, Watkinson JC, Franklyn J. The management of the solitary thyroid nodule: a review. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1999;24(5):388-97.
37. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(21):1600-8.
38. Loh KC. Familial nonmedullary thyroid carcinoma: a meta-review of case series. *Thyroid*. 1997;7(1):107-13.
39. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med*. 1993;328(8):553-9.
40. Hay ID, Grant CS, van Heerden JA, Goellner JR, Ebersold JR, Bergstralh EJ. Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 535 cases observed in a 50-year period. *Surgery*. 1992;112(6):1139-46; discussion 46-7.
41. Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1764-71.
42. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1-133.

43. Alexander EK, Heering JP, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Cibas ES, et al. Assessment of nondiagnostic ultrasound-guided fine needle aspirations of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):4924-7.
44. Chammas MC, Gerhard R, de Oliveira IR, Widman A, de Barros N, Durazzo M, et al. Thyroid nodules: evaluation with power Doppler and duplex Doppler ultrasound. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;132(6):874-82.
45. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid.* 2009;19(11):1159-65.
46. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *J Am Soc Cytopathol.* 2017;6(6):217-22.
47. McHenry CR, Walfish PG, Rosen IB. Non-diagnostic fine needle aspiration biopsy: a dilemma in management of nodular thyroid disease. *Am Surg.* 1993;59(7):415-9.
48. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande AA, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer.* 2007;111(6):508-16.
49. Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta Cytol.* 1987;31(5):587-90.
50. Renshaw AA. Accuracy of thyroid fine-needle aspiration using receiver operator characteristic curves. *Am J Clin Pathol.* 2001;116(4):477-82.
51. Amrikachi M, Ramzy I, Rubinfeld S, Wheeler TM. Accuracy of fine-needle aspiration of thyroid. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125(4):484-8.
52. Kim SK, Hwang TS, Yoo YB, Han HS, Kim DL, Song KH, et al. Surgical results of thyroid nodules according to a management guideline based on the BRAF(V600E) mutation status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(3):658-64.
53. Adeniran AJ, Hui P, Chhieng DC, Prasad ML, Schofield K, Theoharis C. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration specimens enhances the predictability of malignancy in thyroid follicular lesions of undetermined significance. *Acta Cytol.* 2011;55(6):570-5.

54. Nikiforov YE. Role of Molecular Markers in Thyroid Nodule Management: Then and Now. *Endocr Pract.* 2017;23(8):979-88.
55. Bernet V, Hupart KH, Parangi S, Woeber KA. AACE/ACE disease state commentary: molecular diagnostic testing of thyroid nodules with indeterminate cytopathology. *Endocr Pract.* 2014;20(4):360-3.
56. D'Cruz AK, Vaish R, Vaidya A, Nixon IJ, Williams MD, Vander Poorten V, et al. Molecular markers in well-differentiated thyroid cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018;275(6):1375-84.
57. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, et al. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid.* 2015;25(11):1217-23.
58. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, et al. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer.* 2014;120(23):3627-34.
59. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med.* 2012;367(8):705-15.
60. Lithwick-Yanai G, Dromi N, Shtabsky A, Morgenstern S, Strenov Y, Feinmesser M, et al. Multicentre validation of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. *J Clin Pathol.* 2017;70(6):500-7.
61. Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, Lupo MA, Manganelli ML, Andruss B, et al. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(7):2743-50.
62. Eszlinger M, Bohme K, Ullmann M, Gorke F, Siebolts U, Neumann A, et al. Evaluation of a Two-Year Routine Application of Molecular Testing of Thyroid Fine-Needle Aspirations Using a Seven-Gene Panel in a Primary Referral Setting in Germany. *Thyroid.* 2017;27(3):402-11.

63. Noureldine SI, Najafian A, Aragon Han P, Olson MT, Genther DJ, Schneider EB, et al. Evaluation of the Effect of Diagnostic Molecular Testing on the Surgical Decision-Making Process for Patients With Thyroid Nodules. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016;142(7):676-82.
64. Roth MY, Witt RL, Steward DL. Molecular testing for thyroid nodules: Review and current state. *Cancer.* 2018;124(5):888-98.
65. Labourier E. Utility and cost-effectiveness of molecular testing in thyroid nodules with indeterminate cytology. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;85(4):624-31.
66. Shimamoto K, Satake H, Sawaki A, Ishigaki T, Funahashi H, Imai T. Preoperative staging of thyroid papillary carcinoma with ultrasonography. *Eur J Radiol.* 1998;29(1):4-10.
67. Stulak JM, Grant CS, Farley DR, Thompson GB, van Heerden JA, Hay ID, et al. Value of preoperative ultrasonography in the surgical management of initial and reoperative papillary thyroid cancer. *Arch Surg.* 2006;141(5):489-94; discussion 94-6.
68. Snozek CL, Chambers EP, Reading CC, Sebo TJ, Sistrunk JW, Singh RJ, et al. Serum thyroglobulin, high-resolution ultrasound, and lymph node thyroglobulin in diagnosis of differentiated thyroid carcinoma nodal metastases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4278-81.
69. Choi JS, Kim J, Kwak JY, Kim MJ, Chang HS, Kim EK. Preoperative staging of papillary thyroid carcinoma: comparison of ultrasound imaging and CT. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;193(3):871-8.
70. Demeure MJ, Clark OH. Surgery in the treatment of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1990;19(3):663-83.
71. Solomon BL, Wartofsky L, Burman KD. Current trends in the management of well differentiated papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):333-9.
72. Patwardhan N, Cataldo T, Braverman LE. Surgical management of the patient with papillary cancer. *Surg Clin North Am.* 1995;75(3):449-64.

73. Mazzaferri EL. An overview of the management of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid*. 1999;9(5):421-7.
74. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS, et al. Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Ann Surg*. 2007;246(3):375-81; discussion 81-4.
75. Adam MA, Pura J, Goffredo P, Dinan MA, Hyslop T, Reed SD, et al. Impact of extent of surgery on survival for papillary thyroid cancer patients younger than 45 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(1):115-21.
76. Adam MA, Pura J, Gu L, Dinan MA, Tyler DS, Reed SD, et al. Extent of surgery for papillary thyroid cancer is not associated with survival: an analysis of 61,775 patients. *Ann Surg*. 2014;260(4):601-5; discussion 5-7.
77. Nixon IJ, Ganly I, Patel SG, Palmer FL, Whitcher MM, Tuttle RM, et al. Thyroid lobectomy for treatment of well differentiated intrathyroid malignancy. *Surgery*. 2012;151(4):571-9.
78. Barney BM, Hitchcock YJ, Sharma P, Shrieve DC, Tward JD. Overall and cause-specific survival for patients undergoing lobectomy, near-total, or total thyroidectomy for differentiated thyroid cancer. *Head Neck*. 2011;33(5):645-9.
79. 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.
80. Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World J Surg*. 2010;34(1):28-35.
81. Ito Y, Miyauchi A. Nonoperative management of low-risk differentiated thyroid carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(1):15-20.
82. Sugitani I, Toda K, Yamada K, Yamamoto N, Ikenaga M, Fujimoto Y. Three distinctly different kinds of papillary thyroid microcarcinoma should be recognized: our treatment strategies and outcomes. *World J Surg*. 2010;34(6):1222-31.

83. Tuttle RM, Fagin JA, Minkowitz G, Wong RJ, Roman B, Patel S, et al. Natural History and Tumor Volume Kinetics of Papillary Thyroid Cancers During Active Surveillance. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017;143(10):1015-20.
84. Brito JP, Ito Y, Miyauchi A, Tuttle RM. A Clinical Framework to Facilitate Risk Stratification When Considering an Active Surveillance Alternative to Immediate Biopsy and Surgery in Papillary Microcarcinoma. *Thyroid*. 2016;26(1):144-9.
85. Moreno MA, Edeiken-Monroe BS, Siegel ER, Sherman SI, Clayman GL. In papillary thyroid cancer, preoperative central neck ultrasound detects only macroscopic surgical disease, but negative findings predict excellent long-term regional control and survival. *Thyroid*. 2012;22(4):347-55.
86. Hughes DT, White ML, Miller BS, Gauger PG, Burney RE, Doherty GM. Influence of prophylactic central lymph node dissection on postoperative thyroglobulin levels and radioiodine treatment in papillary thyroid cancer. *Surgery*. 2010;148(6):1100-6; discussion 006-7.
87. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-9.
88. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(11):1167-214.
89. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, et al. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol*. 2016;2(8):1023-9.
90. Byrd JK, Yawn RJ, Wilhoit CS, Sora ND, Meyers L, Fernandes J, et al. Well differentiated thyroid carcinoma: current treatment. *Curr Treat Options Oncol*. 2012;13(1):47-57.
91. Lin JD, Chao TC, Chou SC, Hsueh C. Papillary thyroid carcinomas with lung metastases. *Thyroid*. 2004;14(12):1091-6.

92. Nixon IJ, Whitcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, et al. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*. 2012;22(9):884-9.
93. Sugitani I, Fujimoto Y, Yamamoto N. Papillary thyroid carcinoma with distant metastases: survival predictors and the importance of local control. *Surgery*. 2008;143(1):35-42.
94. Song HJ, Qiu ZL, Shen CT, Wei WJ, Luo QY. Pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: efficacy of radioiodine therapy and prognostic factors. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(3):399-408.
95. Sciuto R, Romano L, Rea S, Marandino F, Sperduti I, Maini CL. Natural history and clinical outcome of differentiated thyroid carcinoma: a retrospective analysis of 1503 patients treated at a single institution. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1728-35.
96. Eustatia-Rutten CF, Corssmit EP, Biermasz NR, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW. Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):313-9.
97. Wu HS, Young MT, Ituarte PH, D'Avanzo A, Duh QY, Greenspan FS, et al. Death from thyroid cancer of follicular cell origin. *J Am Coll Surg*. 2000;191(6):600-6.
98. Akslen LA, Haldorsen T, Thoresen SO, Glatre E. Survival and causes of death in thyroid cancer: a population-based study of 2479 cases from Norway. *Cancer Res*. 1991;51(4):1234-41.
99. de Melo TG, Zantut-Wittmann DE, Ficher E, da Assumpcao LV. Factors related to mortality in patients with papillary and follicular thyroid cancer in long-term follow-up. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(12):1195-200.
100. Kitamura Y, Shimizu K, Nagahama M, Sugino K, Ozaki O, Mimura T, et al. Immediate causes of death in thyroid carcinoma: clinicopathological analysis of 161 fatal cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(11):4043-9.
101. Lerch H, Schober O, Kuwert T, Saur HB. Survival of differentiated thyroid carcinoma studied in 500 patients. *J Clin Oncol*. 1997;15(5):2067-75.

102. Steinmuller T, Klupp J, Rayes N, Ulrich F, Jonas S, Graf KJ, et al. Prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Surg*. 2000;166(1):29-33.
103. Kim HJ, Sung JY, Oh YL, Kim JH, Son YI, Min YK, et al. Association of vascular invasion with increased mortality in patients with minimally invasive follicular thyroid carcinoma but not widely invasive follicular thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2014;36(12):1695-700.
104. Kim M, Kim YN, Kim WG, Park S, Kwon H, Jeon MJ, et al. Optimal cut-off age in the TNM Staging system of differentiated thyroid cancer: is 55 years better than 45 years? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;86(3):438-43.
105. Simpson WJ, Panzarella T, Carruthers JS, Gospodarowicz MK, Sutcliffe SB. Papillary and follicular thyroid cancer: impact of treatment in 1578 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1988;14(6):1063-75.
106. 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.
107. Brennan MD, Bergstralh EJ, van Heerden JA, McConahey WM. Follicular thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc*. 1991;66(1):11-22.
108. Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Haynie TP, Johnston DA, et al. The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75(3):714-20.
109. 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.
110. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer*. 1997;79(3):564-73.

111. Bellantone R, Lombardi CP, Boscherini M, Ferrante A, Raffaelli M, Rubino F, et al. Prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma: a multivariate analysis of 234 consecutive patients. *J Surg Oncol*. 1998;68(4):237-41.
112. Tsang RW, Brierley JD, Simpson WJ, Panzarella T, Gospodarowicz MK, Sutcliffe SB. The effects of surgery, radioiodine, and external radiation therapy on the clinical outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer*. 1998;82(2):375-88.
113. Kuijpers JL, Hansen B, Hamming JF, Ribot JG, Haak HR, Coebergh JW. Trends in treatment and long-term survival of thyroid cancer in southeastern Netherlands, 1960-1992. *Eur J Cancer*. 1998;34(8):1235-41.
114. Tzavara I, Vlassopoulou B, Alevizaki C, Koukoulis G, Tzanela M, Koumoussi P, et al. Differentiated thyroid cancer: a retrospective analysis of 832 cases from Greece. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;50(5):643-54.
115. Duren M, Yavuz N, Bukey Y, Ozyegin MA, Gundogdu S, Acbay O, et al. Impact of initial surgical treatment on survival of patients with differentiated thyroid cancer: experience of an endocrine surgery center in an iodine-deficient region. *World J Surg*. 2000;24(11):1290-4.
116. Lin JD, Hsieh SH, Chang HY, Huang CC, Chao TC. Outcome after treatment for papillary thyroid cancer. *Head Neck*. 2001;23(2):140-6.
117. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg*. 2002;26(8):879-85.
118. Chow SM, Law SC, Au SK, Leung TW, Chan PT, Mendenhall WM, et al. Differentiated thyroid carcinoma: comparison between papillary and follicular carcinoma in a single institute. *Head Neck*. 2002;24(7):670-7.
119. Bhattacharyya N. A population-based analysis of survival factors in differentiated and medullary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;128(1):115-23.

120. Lundgren CI, Hall P, Ekblom A, Frisell J, Zedenius J, Dickman PW. Incidence and survival of Swedish patients with differentiated thyroid cancer. *Int J Cancer*. 2003;106(4):569-73.
121. Eichhorn W, Tabler H, Lippold R, Lochmann M, Schreckenberger M, Bartenstein P. Prognostic factors determining long-term survival in well-differentiated thyroid cancer: an analysis of four hundred eighty-four patients undergoing therapy and aftercare at the same institution. *Thyroid*. 2003;13(10):949-58.
122. 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.
123. Nilubol N, Kebebew E. Should small papillary thyroid cancer be observed? A population-based study. *Cancer*. 2015;121(7):1017-24.
124. Ganly I, Nixon IJ, Wang LY, Palmer FL, Migliacci JC, Aniss A, et al. Survival from Differentiated Thyroid Cancer: What Has Age Got to Do with It? *Thyroid*. 2015;25(10):1106-14.
125. Bischoff LA, Curry J, Ahmed I, Pribitkin E, Miller JL. Is above age 45 appropriate for upstaging well-differentiated papillary thyroid cancer? *Endocr Pract*. 2013;19(6):995-7.
126. Nixon IJ, Wang LY, Migliacci JC, Eskander A, Campbell MJ, Aniss A, et al. An International Multi-Institutional Validation of Age 55 Years as a Cutoff for Risk Stratification in the AJCC/UICC Staging System for Well-Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(3):373-80.
127. Youngwirth LM, Adam MA, Scheri RP, Roman SA, Sosa JA. Extrathyroidal Extension Is Associated with Compromised Survival in Patients with Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2017;27(5):626-31.
128. Furlan JC, Bedard YC, Rosen IB. Clinicopathologic significance of histologic vascular invasion in papillary and follicular thyroid carcinomas. *J Am Coll Surg*. 2004;198(3):341-8.
129. Collini P, Sampietro G, Pilotti S. Extensive vascular invasion is a marker of risk of relapse in encapsulated non-Hurthle cell follicular carcinoma of the thyroid

gland: a clinicopathological study of 18 consecutive cases from a single institution with a 11-year median follow-up. *Histopathology*. 2004;44(1):35-9.

130. Falvo L, Catania A, D'Andrea V, Marzullo A, Giustiniani MC, De Antoni E. Prognostic importance of histologic vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg*. 2005;241(4):640-6.

131. Cao J, Hu JL, Chen C, Wang QL, Fang XH, Zhang Y, et al. Vascular invasion is an independent prognostic factor for distant recurrence-free survival in papillary thyroid carcinoma: a matched-case comparative study. *J Clin Pathol*. 2016;69(10):872-7.

132. Vuong HG, Kondo T, Duong UNP, Pham TQ, Oishi N, Mochizuki K, et al. Prognostic Impact of Vascular Invasion in Differentiated Thyroid Carcinoma - a Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Endocrinol*. 2017.

133. Ain KB. Papillary thyroid carcinoma. Etiology, assessment, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1995;24(4):711-60.

134. Robbins RJ, Wan Q, Grewal RK, Reibke R, Gonen M, Strauss HW, et al. Real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography scanning. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(2):498-505.

135. Hirsch D, Levy S, Tsvetov G, Gorshtein A, Slutzky-Shraga I, Akirov A, et al. Long-Term Outcomes and Prognostic Factors in Patients with Differentiated Thyroid Cancer and Distant Metastases. *Endocr Pract*. 2017;23(10):1193-200.

136. Sohn SY, Kim HI, Kim YN, Kim TH, Kim SW, Chung JH. Prognostic indicators of outcomes in patients with lung metastases from differentiated thyroid carcinoma during long-term follow-up. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;88(2):318-26.

137. Qiu ZL, Shen CT, Luo QY. Clinical management and outcomes in patients with hyperfunctioning distant metastases from differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine therapy. *Thyroid*. 2015;25(2):229-37.

138. Showalter TN, Siegel BA, Moley JF, Baranski TJ, Grigsby PW. Prognostic factors in patients with well-differentiated thyroid cancer presenting with pulmonary metastasis. *Cancer Biother Radiopharm*. 2008;23(5):655-9.

139. Antonelli A, Fallahi P, Ferrari SM, Carpi A, Berti P, Materazzi G, et al. Dedifferentiated thyroid cancer: a therapeutic challenge. *Biomed Pharmacother.* 2008;62(8):559-63.
140. Tollefsen HR, Decosse JJ, Hutter RV. Papillary Carcinoma of the Thyroid. A Clinical and Pathological Study of 70 Fatal Cases. *Cancer.* 1964;17:1035-44.
141. Smith SA, Hay ID, Goellner JR, Ryan JJ, McConahey WM. Mortality from papillary thyroid carcinoma. A case-control study of 56 lethal cases. *Cancer.* 1988;62(7):1381-8.
142. Pacini F, Castagna MG. Approach to and treatment of differentiated thyroid carcinoma. *Med Clin North Am.* 2012;96(2):369-83.
143. Maciel RM, Kimura ET, Cerutti JM. Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49(5):691-700.
144. Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, Vorontsova TV, Mondellini P, Bongarzone I, et al. Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res.* 1995;55(23):5617-20.
145. Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, Mizuno T, Tronko ND, Komissarenko IV, et al. Activated RET oncogene in thyroid cancers of children from areas contaminated by Chernobyl accident. *Lancet.* 1994;344(8917):259.
146. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5399-404.
147. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(7):1454-7.
148. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(2):245-62.

149. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer*. 2007;110(1):38-46.
150. Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(7):3211-6.
151. Vuong HG, Duong UN, Altibi AM, Ngo HT, Pham TQ, Tran HM, et al. A meta-analysis of prognostic roles of molecular markers in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Connect*. 2017;6(3):R8-R17.
152. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007;28(7):742-62.
153. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2840-3.
154. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2012;118(7):1764-73.
155. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA*. 2013;309(14):1493-501.
156. Henke LE, Pfeifer JD, Ma C, Perkins SM, DeWees T, El-Mofty S, et al. BRAF mutation is not predictive of long-term outcome in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Med*. 2015;4(6):791-9.
157. Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(5):274-86.
158. Santoro M, Sabino N, Ishizaka Y, Ushijima T, Carlomagno F, Cerrato A, et al. Involvement of RET oncogene in human tumours: specificity of RET activation to thyroid tumours. *Br J Cancer*. 1993;68(3):460-4.

159. Powell DJ, Jr., Russell J, Nibu K, Li G, Rhee E, Liao M, et al. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res.* 1998;58(23):5523-8.
160. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014;159(3):676-90.
161. Mayr B, Brabant G, Goretzki P, Ruschoff J, Dietmaier W, Dralle H. ret/PTC-1, -2, and -3 oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential? *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(4):1306-7.
162. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2002;13(1):3-16.
163. Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L, et al. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61(2):239-43.
164. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2745-52.
165. Oikonomou E, Koustas E, Goulielmaki M, Pintzas A. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget.* 2014;5(23):11752-77.
166. Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, et al. The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid.* 2012;22(7):683-9.
167. Jang EK, Song DE, Sim SY, Kwon H, Choi YM, Jeon MJ, et al. NRAS codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2014;24(8):1275-81.
168. Marotta V, Sciammarella C, Colao A, Faggiano A. Application of molecular biology of differentiated thyroid cancer for clinical prognostication. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(11):R499-R515.

169. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(8):3947-52.
170. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(8):1016-23.
171. 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.
172. Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simoes M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(4):R117-26.
173. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4):603-10.
174. Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhaes A, Costa BM, Mancini A, Song JS, et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res.* 2016;14(4):315-23.
175. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):E754-65.
176. Gandolfi G, Ragazzi M, Frasoldati A, Piana S, Ciarrocchi A, Sancisi V. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(4):403-13.
177. Liu R, Bishop J, Zhu G, Zhang T, Ladenson PW, Xing M. Mortality Risk Stratification by Combining BRAF V600E and TERT Promoter Mutations in Papillary Thyroid Cancer: Genetic Duet of BRAF and TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer Mortality. *JAMA Oncol.* 2017;3(2):202-8.

178. Moon S, Song YS, Kim YA, Lim JA, Cho SW, Moon JH, et al. Effects of Coexistent BRAFV600E and TERT Promoter Mutations on Poor Clinical Outcomes in Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *Thyroid*. 2017;27(5):651-60.
179. Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer*. 1996;73(2):139-43.
180. Nagao T. "Dedifferentiation" and high-grade transformation in salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol*. 2013;7 Suppl 1:S37-47.
181. Kizys MM, Cardoso MG, Lindsey SC, Harada MY, Soares FA, Melo MC, et al. Optimizing nucleic acid extraction from thyroid fine-needle aspiration cells in stained slides, formalin-fixed/paraffin-embedded tissues, and long-term stored blood samples. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(9):618-26.
182. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
183. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.
184. Massin JP, Savoie JC, Garnier H, Guiraudon G, Leger FA, Bacourt F. Pulmonary metastases in differentiated thyroid carcinoma. Study of 58 cases with implications for the primary tumor treatment. *Cancer*. 1984;53(4):982-92.
185. Sabra MM, Sherman EJ, Tuttle RM. Tumor volume doubling time of pulmonary metastases predicts overall survival and can guide the initiation of multikinase inhibitor therapy in patients with metastatic, follicular cell-derived thyroid carcinoma. *Cancer*. 2017.
186. Mazzaferri EL, Robbins RJ, Spencer CA, Braverman LE, Pacini F, Wartofsky L, et al. A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1433-41.
187. Ito Y, Miyauchi A, Ito M, Yabuta T, Masuoka H, Higashiyama T, et al. Prognosis and prognostic factors of differentiated thyroid carcinoma after the

appearance of metastasis refractory to radioactive iodine therapy. *Endocr J*. 2014;61(8):821-4.

188. Brownlie BJ, Turner J, Abdelaal AS. Deaths due to differentiated thyroid cancer: a South Island, New Zealand experience: 1984-2009. *N Z Med J*. 2012;125(1363):13-21.

189. Ronga G, Filesi M, Montesano T, Melacrinis FF, Di Nicola A, Ventroni G, et al. Death from differentiated thyroid carcinoma: retrospective study of a 40-year investigation. *Cancer Biother Radiopharm*. 2002;17(5):507-14.

190. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(1):42-50.

191. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6373-9.

192. Ibrahimasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, et al. Genomic Alterations in Fatal Forms of Non-Anaplastic Thyroid Cancer: Identification of MED12 and RBM10 as Novel Thyroid Cancer Genes Associated with Tumor Virulence. *Clin Cancer Res*. 2017;23(19):5970-80.

193. Song YS, Lim JA, Choi H, Won JK, Moon JH, Cho SW, et al. Prognostic effects of TERT promoter mutations are enhanced by coexistence with BRAF or RAS mutations and strengthen the risk prediction by the ATA or TNM staging system in differentiated thyroid cancer patients. *Cancer*. 2016;122(9):1370-9.

194. da Silva RC, de Paula HS, Leal CB, Cunha BC, de Paula EC, Alencar RC, et al. BRAF overexpression is associated with BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinomas. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):5065-75.

195. Dutenthefner SE, Marui S, Santos AB, de Lima EU, Inoue M, Neto JS, et al. BRAF: a tool in the decision to perform elective neck dissection? *Thyroid*. 2013;23(12):1541-6.

196. Kim TH, Kim YE, Ahn S, Kim JY, Ki CS, Oh YL, et al. TERT promoter mutations and long-term survival in patients with thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(10):813-23.