ALINE DE OLIVEIRA RIBEIRO VIANA

**Expressão de marcadores moleculares
preditivos de recorrência loco-regional de
carcinoma papilífero de tireoide**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Viana, Aline de Oliveira Ribeiro
Expressão de marcadores moleculares preditivos
de recorrência loco-regional de carcinoma papilífero
de tireoide / Aline de Oliveira Ribeiro Viana. --
São Paulo, 2018.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientador: Luiz Paulo Kowalski.

Descritores: 1.Neoplasias da glândula tireoide
2.Imuno-histoquímica 3.Recidiva 4.Biomarcadores
tumoriais 5.Prognóstico 6.Carcinoma papilar

USP/FM/DBD-470/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico este trabalho a **minha família**, especialmente:

Ao meu esposo **Rodrigo**, meu amor e companheiro de vida, pelo incentivo, paciência, apoio e cuidado comigo e com nossa família, sempre;

Às minhas filhas **Sofia e nossa segunda princesinha**, que me deram a oportunidade de ser mãe e descobrir esse amor incondicional e puro, fonte de inspiração, alegrias e forças para a finalização deste trabalho;

Aos meus queridos e amados pais, **Josemir e Lúcio Flávio**, que me educaram e me ensinaram valores que me transformaram na pessoa que sou hoje;

Aos meus irmãos, **Michelle, Simone e Guilherme**, sempre presentes na minha vida, torcendo e comemorando com as minhas vitórias e sofrendo junto nos momentos de angústia.

Agradeço a todos vocês pelo estímulo, apoio, compreensão, carinho e amor.

Agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste estudo e, em especial,

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, pela oportunidade, confiança, sugestões e orientações dadas a mim, fatores imprescindíveis para a realização deste estudo, além de ser fonte de estímulo e inspiração para todos nós.

Ao **Dr. João Gonçalves Filho**, pelas orientações específicas e toda ajuda na análise dos dados.

À **Dra. Ana Lúcia Noronha Francisco**, pela amizade, companheirismo e disposição, além de grande auxílio desde os primeiros passos deste projeto até o seu término.

A todos os colaboradores do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, por tantas providências tomadas, em especial: **Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto** pela leitura e análise das lâminas; **Sueli Nonogaki**, pela realização das imunoistoquímicas; **Carlos Ferreira**, pela construção do TMA e **Severino da Silva Ferreira**, pela confecção das lâminas.

Aos Drs. **Mauro Kasuo Ikeda**, **Marcos Brasilino de Carvalho** e **Fábio Montenegro**, pelas sugestões e orientações dispensadas em meu exame de qualificação.

A todos os que me ajudaram, e que comigo conviveram, e que porventura não tiveram seus nomes escritos nesta página, meu sincero agradecimento.

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.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Neoplasia Maligna da Glândula Tireoide	2
1.2 Biomarcadores imunoistoquímicos em carcinoma de tireoide	8
1.2.1 Galectina-3	10
1.2.2 Citoqueratina 19.....	11
1.2.3 Ki-67	13
1.2.4 EGFR e Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo principal.....	17
2.2 Objetivos secundários	17
3 MÉTODOS	18
3.1 Tipo de estudo	19
3.2 Seleção dos pacientes	19
3.3 Critérios de inclusão.....	20
3.4 Critérios de exclusão	20
3.5 Casuística	21
3.6 <i>Tissue Microarray</i>	27
3.7 Análise de marcadores	27
3.8 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Análise de uniformidade entre os grupos caso e controle.....	35
4.2 Resultado clínico	37

4.3 Análise da imunoexpressão dos marcadores analisados	40
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES	64
7 ANEXOS	66
7.1 Anexo A- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	67
7.2 Anexo B - Ficha de Registro dos dados	70
7.3 Anexo C- Artigo.....	74
8 REFERÊNCIAS.....	86

Listas

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cm	centímetro
cont.	continuação
et al.	e outros
fig.	Figura
H&E	hematoxilina e eosina
I131	Iodo radioativo-131
kDa	kilodalton
mCi	miliCurie
miRNA	microRNA (micro ácido ribonucleico)
mm	milímetro
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
x	versus
%	por cento
>	maior que
<	menor que
≥	maior ou igual a
N0	ausência de metástase linfonodal
N+	presença de metástase linfonodal

SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
CK-19	Citoqueratina-19
<i>cDNA microarray</i>	microarranjo de ácido desoxirribonucleico
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
CRD	carbohydrate recognition domains
EET	Extensão extratireoideana
EGFR	epitelial growth fator receptor (receptor de fator de crescimento tumoral)
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
EUA	Estados Unidos da América
Gal-3	galectina-3
HBME-1	<i>Hector Battifora mesothelial-1</i>
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer</i>
IVL	Invasão Vascular Linfática
IPN	Invasão Perineural
IVS	Invasão Vascular Sanguínea
MAPK	proteína kinase mitógeno-ativada
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
NIS	Simportador sódio-iodo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAAF	punção aspirativa por agulha fina
PET-CT	<i>Positron Emission Tomography – Computed Tomography</i> (Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons)
PCI	Pesquisa de corpo inteiro
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RNA	ácido ribonucleico
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SLD	sobrevida livre de doença

SNC	sistema nervoso central
TMA	<i>tissue microarray</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
US	ultrassonografia
USP	Universidade de São Paulo

FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama consort de grupo de seleção dos pacientes	23
Figura 2 -	Fotomicroscopia exibindo reações em hematoxilina-eosina (HE). (A) TMA do grupo caso (20x); (B) Carcinoma papilífero (100x)	30
Figura 3 -	Fotomicroscopia exibe reações imunoistoquímicas (A) EGFR, marcação negativa em todo o campo analisado (100x); (B) Galectina-3, marcação citoplasmática forte e difusa (100x).....	30
Figura 4 -	Fotomicroscopia exibe positividade imunoistoquímica com marcação nuclear para Ki-67 (100x). (A) Alto índice de marcação; (B) Baixo índice de marcação.....	31
Figura 5 -	Fotomicroscopia exibe positividade imunoistoquímica com marcação citoplasmática para CK-19 (100x). (A) Marcação difusa; (B) Marcação focal.....	31
Figura 6 -	Fotomicroscopia exibindo reações imunoistoquímicas. (A) NFκB p65/50; (B) NFκB p105/50 exibindo marcação forte e difusa (x100)	32
Figura 7 -	Sobrevida Global entre os grupos caso e controle estudados (Kaplan-Meier).....	39
Figura 8 -	Sobrevida livre de recorrência dos 42 pacientes com carcinoma papilífero de tireoide estudados (Kaplan-Meier)	39
Figura 9 -	Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e imunoexpressão da Citoqueratina-19 (Kaplan-Meier).....	52
Figura 10 -	Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e imunoexpressão da Galectina-3 (Kaplan-Meier)	53
Figura 11 -	Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e imunoexpressão do Ki-67 (Kaplan-Meier)	53
Figura 12 -	Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e classificação de risco ATA (Kaplan-Meier)	54
Figura 13 -	Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e reclassificação de risco ATA com inclusão Ki-67(Kaplan-Meier).....	54

TABELAS

Tabela 1 -	Características clínico-patológicas dos casos e controles selecionados	26
Tabela 2 -	Marcadores utilizados neste estudo.....	28
Tabela 3 -	Verificação de uniformidade entre os grupos casos e controle	36
Tabela 4 -	Imunoexpressão de CK-19, Gal-3 e Ki-67 entre os grupos caso e controle.....	40
Tabela 5 -	Relação da imunoexpressão da citoqueratina-19 com variáveis clínico-patológicas no grupo caso	42
Tabela 6 -	Relação da imunoexpressão da Galectina-3 com variáveis clínico-patológicas no grupo caso	43
Tabela 7 -	Relação da imunoexpressão do Ki-67 com variáveis clínico-patológicas no grupo caso	44
Tabela 8 -	Relação da imunoexpressão dos marcadores com o tempo de recorrência.....	45
Tabela 9 -	Relação da expressão dos marcadores com classificação de Risco ATA	46
Tabela 10 -	Relação da imunoexpressão da Citoqueratina-19 no tumor (T) e na recidiva tumoral (R).	47
Tabela 11 -	Relação da imunoexpressão da Galectina-3 no tumor (T) e na recidiva tumoral (R)	47
Tabela 12 -	Relação da imunoexpressão do Ki-76 no tumor (T) e na recidiva tumoral (R)	48
Tabela 13 -	Análise da regressão logística da imunoexpressão de CK-19, Gal-3 e Ki-67 entre os grupos caso e controle quanto ao risco de recorrência.....	48
Tabela 14 -	Classificação de risco de recorrência incluindo Ki-67.....	50
Tabela 15 -	Classificação de risco de recorrência incluindo CK-19	50
Tabela 16 -	Taxa de recorrência loco-regional entre os pacientes casos e controle após nova estratificação de Risco (ATA+Ki-67).....	51
Tabela 17 -	Taxa de recorrência loco-regional entre os pacientes casos e controle após nova estratificação de Risco (ATA+CK-19)	51

Resumo

Viana AOR. *Expressão de marcadores moleculares preditivos de recorrência loco-regional de carcinoma papilífero de tireoide* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O carcinoma papilífero é o tumor maligno mais comum da tireoide e sua incidência vem aumentando em todo o mundo nas últimas décadas. A maioria dos pacientes com carcinoma papilífero apresenta bom prognóstico, com uma taxa de sobrevida em 10 anos de 90 a 95%, porém, as taxas de recorrência e a necessidade de continuar o tratamento continuam a ser um problema significativo para 5 a 40% dos pacientes. Embora sejam utilizadas diversas classificações de risco baseadas em diferentes fatores prognósticos, nenhuma é capaz de prever quais pacientes terão maior chance de recorrência e desfecho desfavorável. Este estudo tem como objetivo analisar a expressão de marcadores imunoistoquímicos (Citoqueratina-19, Galectina-3, EGFR, Ki-67, NF-kB) como marcadores preditivos de recorrência no carcinoma papilífero de tireoide. **MÉTODOS:** Estudo retrospectivo caso-controle, que incluiu 42 casos de pacientes com carcinoma papilífero de tireoide tratados cirurgicamente no A.C. Camargo Cancer Center entre janeiro de 2000 e julho de 2010 que apresentaram recorrência diagnosticada durante o período de seguimento. Pacientes do grupo controle foram pareados por gênero, idade, estadiamento patológico T e N. Os casos selecionados tiveram suas características clínicas registradas e variáveis anatopatológicas revistas por um patologista com experiência em patologia tireoideana. As lâminas foram confeccionadas pelo sistema de tissue microarray e foram submetidos a reação de imunoistoquímica. Análise de sobrevida multivariada pelo método de Cox foi aplicada para identificar fatores de risco independentes para recorrência. **RESULTADOS:** Dos 42 casos selecionados, 30 pacientes (71,4%) eram do gênero feminino e 12 (28,6%) do gênero masculino, com a idade variando entre 10 e 80 anos (mediana de 39 anos). A maioria dos pacientes (64,3%) tinha tumores com estadiamento T inicial (T1-T2). Metade da casuística foi classificada como baixo risco, segundo a estratificação de risco da American Thyroid Association (ATA). Dezesete pacientes (40,5%) apresentava risco intermediário e quatro pacientes (9,5%) foram classificados como de alto risco. O tempo de seguimento variou de 46 a 196 meses, com tempo até a recorrência de 2 a 106 meses (mediana de 30 meses). Entre os marcadores analisados, o CK-19 e Ki-67 apresentaram associação estatisticamente significativa com o risco de recorrência ($p=0,029$ e $p=0,007$ respectivamente). Na análise multivariada, a imunoexpressão para os marcadores CK-19 e Ki-67 foram identificados como fatores independentes significativos para predição do risco de recorrência loco-regional (IC-1,14-81,01 e 1,32-7,94, respectivamente). Galectina-3, EGFR e NF-kB não apresentaram associação estatisticamente significante. Não observamos associação entre a imunoexpressão dos marcadores imunoistoquímicos e as variáveis clínico-patológicas estudadas. **CONCLUSÃO:** A análise imunoistoquímica dos marcadores de Ki-67 e CK-19 mostrou-se significativa para prever recorrência tumoral em pacientes com carcinoma papilífero de tireoide.

Descritores: neoplasias da glândula tireoide; imuno-histoquímica; recidiva; biomarcadores tumorais; prognóstico; carcinoma papilar.

Abstract

Viana AOR. *Expression of molecular predictive markers of locoregional recurrence of papillary thyroid carcinoma* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

INTRODUCTION: Papillary carcinoma is the most common malignant thyroid tumor and its incidence has been increasing around the world in recent decades. Most papillary carcinoma have a good prognosis, with a 10-year survival rate of 90-95%, however, as rates of recurrence and salvage treatment remain a significant problem for 5-40% of patients. Although several risk classifications based on prognostic factors are in use, no one is able to predict precisely higher risk of recurrence and unfavorable outcome. The aim of this study is to analyse the immunohistochemical expression of selected markers (Cytokeratin-19, Galectin-3, EGFR, Ki 67, NF- κ B) as predictors of thyroid papillary carcinoma recurrence. **METHODS:** Retrospective case-control study, which included 42 cases of patients with papillary thyroid carcinoma surgically treated at the A.C.Camargo Cancer Center between January 2000 and July 2010. The control group was matched by gender, age, pathological staging T and N stages. Clinical data was registered and pathological characteristics were reviewed by a single pathologist specialized in thyroid diseases. The slides were prepared for microarray tissue system and were submitted to an immunohistochemical reactions. Multivariate Cox method was used to identify the independent risk factors for recurrence. **RESULTS:** Of the 42 selected cases, 30 patients (71.4%) were female and 12 (28.6%) were male, ranging in age from 10 to 80 years (median of 39 years). Most patients (64.3%) had tumors at initial T staging (T1-T2). Half of the sample was classified as low risk according to the American Thyroid Association (ATA) risk stratification. Seventeen patients (40.5%) presented intermediate risk and four patients (9.5%) were classified as high risk. Follow-up ranged from 46 to 196 months, with time to recurrence from 2 to 106 months (median of 30 months). Among the markers analyzed, CK-19 and Ki-67 had a statistically significant association with the risk of recurrence ($p = 0.029$ and $p = 0.007$, respectively). In the multivariate logistic regression analysis, immunoexpression for the CK-19 and Ki-67 markers was independent risk factors for locoregional recurrence (CI-1.14-81.01 and 1.32-7.94, respectively). Galectin-3, EGFR and NF- κ B did not present a statistically significant association in this study. We did not observe an association between the immunoexpression of the immunohistochemical markers and the clinical-pathological variables studied. **CONCLUSION:** The immunohistochemical analysis of the Ki-67 and CK-19 markers are significant predictors of tumor recurrence in patients with papillary thyroid carcinoma.

Descriptors: thyroid neoplasms; immunohistochemistry; recurrence; biomarkers, tumor; prognosis; carcinoma, papillary;

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasia Maligna da Glândula Tireoide

Os carcinomas da glândula tireoide são as neoplasias malignas mais comuns do sistema endócrino e apresentam uma diversidade de tumores que se diferenciam tanto na sua apresentação clínica, como na evolução natural e prognóstico. Elas são subdivididas entre tumores originários das células foliculares e tumores originários das células parafoliculares ou células C. Entre os originários das células foliculares incluem-se os tumores bem diferenciados - representados pelo Carcinoma Papilífero, Carcinoma Folicular e Carcinoma de Células de Hurthle - são os mais frequentes e com comportamento clínico e prognóstico mais favoráveis. Também originários das células foliculares, no entanto, com prognóstico muito desfavorável, estão os tumores indiferenciados ou anaplásicos, compreendem menos de 1% dos casos. O tumor originário das células C, ou parafoliculares, é o Carcinoma Medular de Tireoide, com uma incidência de cerca de 5%, podendo ser esporádico ou familiar, secreta calcitonina e apresenta diferenças significativas quanto a evolução clínica, manejo e prognóstico ¹.

O Carcinoma bem diferenciado de Tireoide foi considerado raro na maioria das populações mundiais, representando entre 2% e 5% dos cânceres em mulheres e menos de 2% em homens. Em muitos países, as taxas de incidência vêm mostrando um padrão de crescimento lento, porém, contínuo (cerca de 1% ao ano) durante as últimas décadas. Nos Estados Unidos, em 2018, a *American Cancer Society* estimou uma incidência de 53.990 novos casos de câncer de tireoide (40.900 em mulheres e 13.090 em homens). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer mostram que, para 2018, a estimativa é de que o câncer de tireoide tenha uma incidência de 9.610 novos casos (8.040 em mulheres e 1.570 em homens); será o 5º câncer mais frequente entre as mulheres, com uma incidência estimada de 7,57 casos a cada 100 mil mulheres ^{2,3}.

Segundo as informações do último volume da publicação *Cancer Incidence in Five Continents*, durante o período de 1973 a 2002, as taxas de incidência aumentaram mais de cinco vezes na maioria das populações analisadas. Estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA), com dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) entre 1975 a 2009 evidenciou um aumento da incidência do carcinoma papilífero de tireoide, sem, no entanto, observar aumento da mortalidade, sugerindo não uma epidemia da doença, mas uma epidemia de diagnóstico ⁴. Uma das razões para o aumento da incidência talvez seja pelo uso cada vez mais frequente de ultrassonografias cervicais e realização de PAAF (punção aspirativa por agulha fina), fazendo com que descubram-se nódulos tireoidianos ainda não palpáveis e faça-se o diagnóstico precoce dessas neoplasias ^{5, 6}. Apesar disso, outros autores acreditam que o aumento observado na tendência da incidência pode ser consequente às mudanças nos fatores ambientais e de estilo de vida ⁷.

Por outro lado, as taxas de mortalidade (<5:100.000) permanecem estáveis nos Estados Unidos da América, provavelmente em virtude do diagnóstico precoce e de melhorias no tratamento ^{4, 5}. Uma análise pontual da incidência e da mortalidade do câncer de tireoide no Brasil mostrou uma grande variação regional, provavelmente secundária a diferença na acessibilidade a métodos de diagnóstico e cobertura dos registros de câncer, além disso, mostrou também uma queda na mortalidade nas últimas duas décadas do século passado ⁸.

O carcinoma papilífero de tireoide é o carcinoma bem diferenciado mais comum, correspondendo a 80% dos casos. Possui crescimento lento e com frequência pode metastatizar para linfonodos cervicais, sendo mais frequentes a presença de comprometimento cervical em sua apresentação inicial em pacientes mais jovens ⁹ sem interferir, no entanto, na sobrevida geral, já que esses pacientes apresentam melhor prognóstico quando comparados com pacientes adultos ^{10, 11, 12}. Invasão vascular é rara, e metástase a distância é observada em menos de 10% dos casos ¹³. Apresenta excelente taxa de controle quando tratado adequadamente e raramente é fatal ¹⁴.

Os principais fatores de risco consolidados na literatura são: exposição à radiação ionizante durante a infância, conforme já provado pelas consequências do

acidente de Chernobyl, história familiar de neoplasia tireoidiana e associações com síndromes genéticas, como Li Fraumeni e polipose adenomatosa familiar do colon^{15, 16}. Os demais fatores de risco estudados, como nível plasmático de hormônio tireoestimulante (TSH), hormônios sexuais, fatores reprodutivos, histórico de nódulos benignos e bócio, hipertireoidismo, padrões dietéticos, obesidade, tabagismo, etilismo e o envolvimento de doenças, como tireoidite de Hashimoto na etiologia da neoplasia maligna da tireoide, ainda não estão bem estabelecidos².

Existem diversas variantes do carcinoma papilífero, sendo as mais comuns as variantes clássica e folicular, as quais apresentam bom prognóstico. Outras variantes do carcinoma papilífero foram associadas a um pior prognóstico, devido a sua maior agressividade biológica, como as variante de células altas, variante esclerosante difusa e variante sólida¹⁷.

O tratamento do carcinoma bem diferenciado de tireoide é fundamentalmente cirúrgico, com taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos de 90-97% para o carcinoma papilífero^{18, 19, 20}. O tratamento cirúrgico de escolha consiste em tireoidectomia total, apesar de que, nos tumores bem diferenciados, a escolha de se realizar tireoidectomia parcial ou total, não parece afetar o resultado do tratamento. A associação do esvaziamento cervical e radioiodoterapia ainda são questões em constante debate, sendo o esvaziamento cervical eletivo ou profilático associado a uma maior incidência de morbidade sem diminuir taxas de recorrência^{21, 22}. Atualmente é recomendado o esvaziamento cervical paratraqueal (nível VI) na presença de metástases clinicamente detectáveis ou tumor primário avançado (T3-4), às custas de maior morbidade, principalmente no que diz respeito ao risco maior de hipoparatiroidismo no pós operatório²². O esvaziamento cervical lateral (níveis II a V) é recomendado apenas quando houver metástase cervical detectável²². A radioiodoterapia adjuvante é realizada nos pacientes de alto risco para recorrência, no intuito de tratar as micrometástases, reduzindo a incidência de recidiva e mortalidade específica nesta população²²⁻²⁵.

A sobrevida geral em 10 anos nos adultos com o diagnóstico de carcinoma papilífero de tireoide é de cerca de 80-95%, e as recorrências locais ou regionais ocorrem em 5-30%²⁶⁻²⁹. Ao falarmos de recorrência no carcinoma papilífero de

tireoide podemos nos referir a recorrência local, relacionada a doença no sítio primário; a doença recorrente regional (metástases linfonodais), ambas podendo associar-se a invasão de esôfago, traqueia e outras estruturas por contiguidade (invasão muscular, tecidos moles e nervos). Com menor frequência observam-se metástases a distância ³⁰.

Muitos fatores podem estar relacionados com a recorrência no câncer de tireoide. Apesar de inúmeros trabalhos estudarem o tema, ainda não se tem um consenso sobre o assunto. A recorrência pode ser resultado de um tratamento inicial incompleto ou presença de fatores prognósticos adversos. Entre os fatores associados a pior prognóstico para o carcinoma papilífero de tireoide incluem-se idade (>45 ou >55anos), sexo (masculino), tamanho tumoral (>4cm), extensão extratireoideana, tipo histológico e presença de metástases ^{12, 14, 25, 31, 32}. Alguns trabalhos evidenciam que o risco de doença persistente (definido como metástase evidenciada na primeira pesquisa de corpo inteiro (PCI) ou detectado em exames de imagem no período de um ano após a ablação, e recorrência tumoral (definido como doença diagnosticada após um ano da ablação) estão relacionadas com características linfonodais, tais como presença de mais de 5 linfonodos positivos no esvaziamento cervical ^{33, 34}, linfonodos positivos > 3,0cm ³³ e na presença de linfonodos identificados na ultrassonografia pré operatória ^{33, 35}.

Diversas classificações foram desenvolvidas na tentativa de distinguir os pacientes com baixo e alto risco e prever a mortalidade doença específica nos tumores bem diferenciados de tireoide, sendo os mais comumente usados: EORTC, Mayo Clinic e Lahey Clinic (AGES e MACIS), Memorial Sloan Kettering Cancer Center (GAMES), Lahey Clinic (AMES), AJCC/UICC TNM, Karolinska Hospital (DAMES) ³⁶⁻³⁸. De uma forma geral, estes sistemas levam em conta a idade, histologia, tamanho tumoral, presença/ ausência de extensão extratireoideana grosseira e presença de metástases a distância. Outros utilizam ainda fatores como grau de diferenciação tumoral, invasão vascular e ressecção cirúrgica adequada. Metástase linfonodal regional é considerada fator prognóstico em alguns sistemas ³⁹.

O sistema TNM foi unificado em 1987 pela *Union for International Cancer Control* (UICC) em associação com *American Joint Committee on Cancer* (AJCC),

sendo recentemente atualizada ⁴⁰. A idade do paciente, que é apontada em diversos sistemas como o fator prognóstico de maior impacto na sobrevida no carcinoma papilífero de tireoide, foi reestratificada pelo sistema TNM. A partir do novo sistema de estadiamento, o ponto de corte para a idade nos carcinomas bem diferenciados de tireoide, passa a ser 55 anos. Pacientes com idade abaixo de 55 anos apresentam melhor prognóstico e são sempre classificados com tumores em estágio clínico I e II, independente da presença ou não de metástases à distância ou loco-regionais. Já os pacientes com idade superior a 55 anos são classificados como na maioria das outras neoplasias em estádios I a IV ⁴⁰.

O sistema MACIS vem sendo recomendado tanto pela *American Thyroid Association* (ATA) como pelo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) *guidelines* para estratificação de risco de pacientes com carcinoma diferenciados da tireoide ³⁹. Além desse e de outros sistemas de estadiamento citados acima, outros fatores obtidos durante o seguimento do paciente, tais como dosagem da tireoglobulina estimulada, uso ou não de dose ablativa de iodo radioativo, avidez de lesões metastáticas vistas ao PET-CT e identificação de recidivas durante o *follow-up*, podem individualizar e modificar a estimativa de risco inicial por ter um significado prognóstico importante ²².

Em 2009, foi publicada pela ATA uma estratificação de risco para pacientes com carcinoma bem diferenciado de tireoide submetidos a tireoidectomia, no intuito de selecionar aqueles pacientes com maior risco de recorrência e/ou persistência de doença. Classificados em três categorias: baixo risco, risco intermediário e alto risco de recorrência. Pacientes de baixo risco são aqueles com tumores <1,0cm, intraglandulares, sem evidência de extensão extratireoideana, invasão vascular ou metástases a distância. Risco intermediário são aqueles tumores com extensão extratireoideana microscópica, metástase linfonodal cervical, doença captante ao I131 em região cervical fora do leito tireoideano, invasão vascular ou tipo histológico agressivo (variante células altas, esclerosante difusa ou sólida). E os pacientes de alto risco são aqueles que apresentam tumores com extensão extratireoideana grosseira, ressecção tumoral incompleta, metástase a distância e níveis altos de tireoglobulina sérica estimulada sugestiva de metástase. Em um follow-up médio de 5-10 anos, a taxa de recorrência foi identificada em menos de 1-

2% em pacientes de baixo risco e cerca de 8% aos pacientes de risco intermediário, submetidos a tireoidectomia total e sem radioterapia na adjuvância ⁴¹. Em 2016, na atualização deste *guideline*, foi proposto a inclusão de avaliação linfonodal na estratificação, onde pacientes cN0 ou pN1, com ≤ 5 linfonodos com micrometástases ($<0,2$ cm) pertenceriam ao grupo de baixo risco; pacientes cN1 ou com >5 linfonodos comprometidos com todos <3 cm pertenceriam ao grupo de risco intermediário e pacientes com pN1 com pelo menos um linfonodo metastático >3 cm estaria incluído no grupo de alto risco ²².

Independentemente do tipo de classificação utilizada, 70 a 85% dos pacientes com carcinoma bem diferenciado de tireoide estão concentrados nos grupos de baixo risco, onde as chances de morte pela neoplasia são menores que 5% ⁴². Para os pacientes contidos no grupo de alto risco, esta possibilidade aumenta para aproximadamente 40%. Assim, os carcinomas bem diferenciados da tireoide podem ter comportamento tanto indolente quanto agressivo ^{43, 44}.

Atualmente, alguns autores tem sugerido que a estratificação de risco pode ser melhorada se revista ao longo do tempo, baseado na resposta a terapia e no curso da doença. Esse novo modelo de estratificação visa identificar aqueles pacientes com uma maior probabilidade de progressão de doença, mesmo após um longo tempo de remissão após terapia inicial ^{22, 45, 46}.

O seguimento dos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide após tratamento cirúrgico é feito com exames clínicos, laboratoriais (tireoglobulina e anticorpos tireoideanos) e de imagem (ultrassonografia, radiografia torácica ou tomografia computadorizada). A dosagem de tireoglobulina estimulada e o uso da Pesquisa de Corpo Inteiro (PCI) com I131 também são realizadas e juntas possuem uma sensibilidade de mais de 90% na detecção de recorrência tumoral ¹⁹. Os *guidelines* atuais determinam que esses pacientes deverão ser acompanhados pelo menos, uma vez ao ano por um período de tempo indeterminado ²².

Em geral, os pacientes que apresentam recorrência são tratados com cirurgia de resgate e/ou dose ablativa de I131, no entanto, 38 a 69% desses morrerão como consequência de doença loco-regional incontrolável ou metástase à distância ^{12, 47}.

O carcinoma papilífero de tireoide, apesar de se tratar de uma neoplasia com prognóstico geralmente favorável e com altas taxas de cura, apresenta algumas controvérsias em relação a fatores preditivos de recorrência e fatores prognósticos, que poderiam influenciar na escolha da extensão do tratamento cirúrgico e na indicação de adjuvância. Pacientes que apresentam recorrências loco-regionais ou metástases a distância podem não ser responsivos à radioiodoterapia, demandam uso de algumas das recentes opções de tratamento sistêmicos com baixas taxas de resposta^{48,49}. Sendo assim, a identificação inicial de casos com maior tendência a disseminação regional ou a distância, por meio de marcadores de comportamento mais agressivo, poderia auxiliar na indicação de tratamento inicial mais intenso, visando reduzir o risco de recorrências e consequentemente de mortalidade.

1.2 Biomarcadores imunoistoquímicos em carcinoma de tireoide

A expressão de proteínas biomarcadoras detectadas por imunoistoquímica (IHQ), análise de expressão de miRNA, painéis de expressões gênicas, entre outras maneiras de detecção, podem auxiliar no entendimento da história natural de diversas neoplasias⁵. Em um esforço pra aumentar a acurácia diagnóstica, muitos marcadores imunoistoquímicos e moleculares tem sido propostos e sua aplicação clínica aumentado progressivamente. IHQ tem sido usada para diferenciação de lesões foliculares tireoideanas, em casos *boderlines*, já que uma das mais frequentes dificuldades dos patologistas é diferenciar adenomas de carcinomas, principalmente nas lesões com arquitetura folicular e irregularidade nuclear. Esses testes são realizados aumentando a acurácia da PAAF e contribuindo na redução de cirurgias desnecessárias ao identificar aqueles pacientes com lesões benignas que não necessitam de ressecção cirúrgica^{50, 51}.

O exame de IHQ é uma técnica importante que reconhece proteínas específicas em espécimes citológicas ou histológicas. A expressão de um conhecido biomarcador é fortemente variável em sensibilidade e especificidade, e, apesar disso, atualmente vários deles são usado rotineiramente em procedimentos diagnósticos citológicos e/ou histológicos. Além de valor diagnóstico, estes biomarcadores podem

ser úteis para avaliar prognóstico e também para detectar doença persistente ou recorrente, bem como definir estratégias terapêuticas ¹⁶.

Vários estudos utilizaram a metodologia do *cDNA microarray* em tireoide e encontraram uma grande variedade de genes diferencialmente expressos entre tireoide normal, lesões não neoplásicas e neoplasias benignas e malignas da tireoide ⁵²⁻⁵⁴. Além dos *cDNA microarrays*, estudos que utilizaram a metodologia de *SAGE* (*serial analysis of gene expression*) também permitiram a análise da expressão de milhares de genes em diferentes tipos de tecidos e tumores, incluindo a glândula tireoide normal e seus tumores ⁵⁵. No entanto, tais estudos geram enormes listas de genes que necessitam de validação e seleção de potenciais marcadores biológicos. Neste sentido, a tecnologia dos *tissue microarrays* (TMAs) é promissora, pois permite a análise de alterações moleculares em centenas de espécimes teciduais, possibilitando a validação de potenciais marcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento. Esta técnica permite, num único experimento, a análise de um grande número de espécimes teciduais que foram previamente fixados em formalina e incluídos em parafina ⁵⁶. Cortes histológicos sequenciais de um único bloco de TMA podem ser submetidos a diferentes tipos de estudo, como, por exemplo, a avaliação das características morfológicas das células e tecidos, a análise da expressão de proteínas através da técnica imunoistoquímica e a detecção de alterações cromossômicas através de técnicas de hibridização *in situ* ⁵⁶⁻⁵⁸.

Alguns estudos investigaram a expressão imunoistoquímica de determinados marcadores em lesões benignas e malignas da tireoide por meio da técnica dos TMAs. Utilizando esta técnica, Liu *et al.* ⁵⁹ observaram um aumento da expressão citoplasmática de galectina-3, fibronectina-1, citoqueratina 19, HBME-1 (*Hector Battifora mesothelial-1*) e NIS (simportador sódio-iodo) em carcinomas papilíferos e foliculares da tireoide. Além disso, o uso de um painel imunistoquímico constituído por uma combinação de pares destes três marcadores - galectina-3, fibronectina-1, NIS - revelou uma acurácia diagnóstica de 98% na diferenciação entre o adenoma folicular e os carcinomas (folicular, papilífero clássico e variante folicular do papilífero) de tireoide.

1.2.1 Galectina-3

As galectinas são proteínas da família das lectinas animais (lectinas endógenas), envolvidas em diversos processos biológicos, tais como interações com glicoconjugados contendo galactose, controle do ciclo celular, proliferação celular, resposta imune, apoptose e em processos neoplásicos ⁵⁹. A galectina-3 também se encontra expressa em várias células envolvidas na resposta imune; monócitos e macrófagos; neutrófilos; eosinófilos; mastócitos e basófilos; células dendríticas e células de Langerhans ⁶⁰.

A estrutura molecular das galectinas consiste de cerca de 130 aminoácidos, altamente conservados, bem como uma região de reconhecimento a carboidratos (CRD – *carbohydrate recognition domains*) e por reconhecer estruturas de β -galactosídeos ⁶¹. Dentre as galectinas identificadas em mamíferos, a galectina-3, é uma das mais estudadas e é uma proteína monomérica de 30 kDa, faz parte das lectinas com afinidade por beta-galactosídeo, sua expressão vem sendo relacionada ao surgimento de tumores e metástases ⁶².

As galectinas vêm sendo largamente utilizadas como ferramenta na imunoistoquímica. É expressa numa grande variedade de células epiteliais em diversos órgãos, incluindo intestino delgado, cólon, mama, rins, próstata, pulmões e pâncreas, por isso, sua expressão foi associada ao câncer nesses vários tecidos e sua regulação negativa pode ter uma associação com a progressão tumoral (isto é, aumentar o grau histológico ou o potencial metastático) nos carcinomas de cólon e mama ^{63, 64}.

A galectina-3 é uma proteína principalmente citosólica, com diversos estudos reportando também para a sua localização na superfície celular, no meio condicionado de algumas linhagens celulares, na matriz extracelular, fluidos biológicos e no soro. Com isso, são conhecidas diversas funções dependentes da sua localização física ⁶⁵. Quando ancorada na membrana celular, a galectina-3 participa na interação célula-célula e célula-matriz. No citoplasma, exerce uma função anti-apoptótica protegendo a célula da apoptose induzida por anticorpos anti-Fas, agentes quimioterápicos, fator de necrose tumoral e óxido nítrico. A localização nuclear está envolvida no processamento do pré-RNA mensageiro. Por isso, desempenha papéis

específicos na adesão celular, proliferação celular, apoptose, transformação neoplásica, inflamação e metástase^{62, 65, 66}.

Na tireoide, uma alta expressão de galectina-3 é observada em neoplasias foliculares, sugerindo o uso da imunodeteção como um potencial marcador de malignidade em neoplasias de tireoide, sendo investigada como um marcador biológico para a distinção de lesões benignas e malignas, tanto em material citológico obtido por punção aspirativa por agulha fina, quanto em cortes histológicos de produtos de tireoidectomia⁶⁷. Nestes espécimes, a galectina-3 tem sido estudada principalmente pelo método imunoistoquímico, geralmente em associação a outros potenciais marcadores. Os estudos mostram que a expressão imunoistoquímica de galectina-3 costuma ser forte e difusa em neoplasias malignas da tireoide, sobretudo no carcinoma papilífero^{51, 67, 68}. Alguns trabalhos relatam uma mudança de expressão a depender do estado de diferenciação da neoplasia tireoideana, onde foi relatado um maior nível de expressão em carcinomas de tireoide bem diferenciados e menor expressão nos carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados^{62, 69, 70}. No entanto, sua imunoexpressão também tem sido observada em alguns casos de lesões benignas da tireoide, incluindo adenomas foliculares, hiperplasias e alguns raros casos de tireoidite de Hashimoto^{16, 67}.

1.2.2 Citoqueratina 19

As proteínas do citoesqueleto são marcadores úteis na avaliação dos tipos celulares e no diagnóstico dos tumores. Para a identificação das células epiteliais, uma classe de filamentos de tamanho intermediário (7 a 10 nm), formada pelas citoqueratinas, é bastante valiosa. O subconjunto das citoqueratinas que uma célula epitelial expressa depende, principalmente, do tipo de epitélio, do momento de diferenciação e do estágio de desenvolvimento da célula. Assim, essas características específicas das citoqueratinas permitem a classificação de todos os epitélio em função do perfil de expressão das citoqueratinas. Além do mais, isso também se aplica aos correspondentes malignos dos epitélios (carcinomas), já que o perfil das citoqueratinas tende a permanecer constante quando um epitélio passa por uma transformação maligna.

A citoqueratina 19 (CK-19), uma proteína de 40 kDa, é a menor de uma classe denominada de citoqueratinas maiores, é fortemente expressa nos carcinomas papilíferos de tireoide, particularmente na sua forma clássica, quando comparados com a variante folicular e outros tipos de neoplasias tireoideanas^{71, 72}. Também teve associação com extensão extratireoideana e estágio pTNM, indicando que a alta expressão desse marcador pode identificar um subgrupo de pior prognóstico entre aqueles com carcinoma papilífero de tireoide⁷².

A CK-19 é um marcador sensível para os carcinomas papilíferos, geralmente, com uma reatividade plasmática difusa forte, enquanto nas lesões tireoideanas benignas e no tecido tireoideano normal, observa-se uma reatividade focal e leve^{73, 74}. Cheung *et al.*⁷³ demonstraram uma imuno-reatividade difusa em 66% dos carcinomas papilíferos da tireoide, positividade difusa em 3 casos de carcinoma insular e em 2 carcinomas foliculares de tireoide ricos em células oxifílicas. Além disso, um caso de adenoma folicular apresentou uma reatividade forte difusa, com um significado ainda incerto.

Sahoo *et al.*⁷⁵ demonstraram positividade em todos os 15 Carcinomas papilíferos de tireoide avaliados, sendo 14 deles com uma positividade para a CK-19 em mais de 75% das células e 1 com uma positividade moderada, entre 5 e 25% das células. Porém, nesse mesmo estudo, dos 20 adenomas foliculares analisados, 15 tiveram menos que 5% das células positivas para a CK-19, 1 mostrou uma positividade entre 5 a 25% e 4 tiveram positividade entre 25 e 75%. Portanto, a reatividade da CK-19 não é específica para o carcinoma papilífero de tireoide, mas o padrão de reação é mais difuso nesse tipo de tumor que no adenoma folicular.

Enquanto o significado da imunoexpressão do CK-19 para diagnóstico diferencial das lesões tireoideanas tem sido largamente usada e debatida, seu valor como fator prognóstico, no carcinoma papilífero, ainda é incerto. No carcinoma hepatocelular e no colangiocarcinoma intrahepático, é bem reconhecido que pacientes que apresentam imunoexpressão para o CK-19 apresentam um pior prognóstico, com o nível de imunoexpressão significativamente relacionada com agressividade tumoral e risco de recorrência pós operatória^{76, 77}.

1.2.3 Ki-67

Ki-67 é uma proteína de ligação ao DNA que é distribuída principalmente no núcleo e está relacionado à proliferação celular, um dos mais importantes fatores para avaliar o comportamento biológico dos carcinomas. Tem um tamanho de 395 kDa e é codificada por quase 30.000 pares. Esta proteína é expressa nos núcleos celulares de todas as células, durante a fase G1, S e G2 do ciclo celular, não sendo expresso nas células que se encontram na fase G0⁷⁸ e é, atualmente, o marcador mais útil para avaliar a atividade de proliferação celular. Existem duas aplicações potenciais para o uso do Ki-67 em neoplasias humanas: no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas, e como valor prognóstico, principalmente em carcinomas.

A alta expressão do Ki-67 tem sido amplamente reconhecida e associada com um mau prognóstico em câncer de mama e câncer de próstata, tendo suas condutas e seguimentos baseados na expressão ou não deste marcador^{79, 80}. Nas neoplasias tireoideanas existem estudos que analisam tanto o valor diagnóstico como prognóstico deste marcador. Dwivedi *et al.*⁸¹ analisaram a expressão do Ki-67 e evidenciaram uma maior expressão deste marcador nos carcinomas papilíferos de tireoide em relação as lesões não neoplásicas, com significância estatística. Miyauchi *et al.*⁸² observaram que o Ki-67 foi um fator prognóstico independente para sobrevida livre de doença e que pacientes com alta expressão do Ki-67 tinha uma pior sobrevida doença específica em relação aqueles pacientes com baixos valores deste marcador.

Ito *et al.*⁸³ identificaram que a expressão do Ki-67 nos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide estava relacionada com a presença de extensão extratireoideana franca e metástase a distância ao diagnóstico, sendo um fator prognóstico independente para a sobrevida livre de doença, além de apresentar pior sobrevida causa específica, quando comparada com aqueles pacientes com uma menor expressão do marcador.

Zhou *et al.*⁸⁴ avaliaram a expressão do Ki-67 em 108 microcarcinomas papilíferos e evidenciaram uma maior expressão nos casos com maior tamanho

tumoral (> 5mm), extensão extratireoideana e metástase linfonodal, sem encontrar relação com sexo e idade.

Tang *et al.*⁸⁵ analisaram a expressão do Ki-67 nos carcinomas papilíferos de tireoide e verificaram que uma maior expressão desta proteína está relacionada a um maior risco de recorrência tumoral.

1.2.4 EGFR e Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um receptor transmembrana tirosino-kinase e frequentemente está expresso em tecidos neoplásicos e não neoplásicos⁸⁶. Constitutivamente, o EGFR ativado promove a proliferação celular e inibe mecanismos apoptóticos através da via de sinalização da proteína kinase mitógeno-ativada (MAPK). Landriscina *et al.*⁸⁷ demonstraram que carcinomas papilíferos de tireoide expressam EGFR, e quando ocorre dediferenciação ou transformação anaplásica, ocorre uma superexpressão deste marcador.

Diversos trabalhos citam a superexpressão do EGFR em tumores malignos, como câncer de mama e bexiga; na neoplasia tireoideana tem sido visto como um fator prognóstico independente, estando associado com altas taxas de mortalidade⁸⁸⁻⁹⁰. Em análise multivariada, a expressão citoplasmática do EGFR mostrou uma correlação significativa com infiltração tumoral no tecido tireoideano adjacente e piora nas taxas de sobrevida livre de recorrência⁸⁸.

O fator nuclear Kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição envolvido principalmente em inflamação, resposta imune, stress celular, câncer e apoptose. A desregulação da via de transdução de sinalização do NF- κ B está associada a uma variedade de cânceres humanos. Este marcador é citado em alguns trabalhos como sendo um preditor de agressividade do carcinoma de tireoide, principalmente o carcinoma anaplásico. No entanto, estudos mais recentes descrevem uma correlação positiva entre a expressão do NF- κ B e carcinoma de tireoide metastático⁹⁰.

Baseado na literatura, nenhum deles, individualmente, é confiável na identificação de todas as neoplasias tireoideanas com grande acurácia. Desta forma,

o uso de uma associação de dois ou três biomarcadores na identificação dessas lesões malignas tem aumentado consideravelmente a sensibilidade e especificidade da análise^{16, 50, 71}.

A maioria dos estudos que analisam marcadores por meio de imunoistoquímica em casos de carcinoma papilífero de tireoide, o fazem no intuito de diferenciar neoplasia benigna e maligna, poucos são os estudos que analisam o valor prognóstico^{51, 62, 69, 70, 72, 74, 83-85, 90-93}. Diante das controvérsias apontadas, propomos um estudo que irá analisar marcadores moleculares selecionados em um grupo de pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma papilífero de tireoide que apresentaram recidiva loco-regional e comparar com um grupo controle sem recidiva para avaliar seu valor prognóstico.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Analisar a expressão imunoistoquímica dos marcadores Citoqueratina 19, Galectina-3, EGFR, Ki-67, NF- κ B em *tissue microarray* de casos de carcinoma papilífero de tireoide que apresentaram recorrência loco-regional e comparadas a um grupo controle sem recorrência.

2.2 Objetivos Secundários

1. Avaliar a eficácia destas proteínas como potenciais marcadores biológicos de valor prognóstico no carcinoma papilífero de tireoide.
2. Analisar a associação da expressão destas proteínas no carcinoma papilífero de tireoide com variáveis clínico-patológicas, como: idade; estadiamento TNM; multicentricidade tumoral; extensão tumoral extra-tireoideana.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Estudo retrospectivo de casos-controle.

3.2 Seleção dos Pacientes

Os prontuários médicos dos pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide admitidos para tratamento cirúrgico no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do A.C.Camargo Cancer Center, no período de 1 de janeiro de 2000 a 31 de julho de 2010, foram selecionados e analisados. Todos os pacientes submetidos a cirurgia na instituição assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que permitiu a utilização de todos os dados clínicos e patológicos que constassem em seu prontuário, resguardando-se o sigilo sobre a identidade do paciente. Além disso, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, sob o nº222.404, em 12 de março de 2013 (Anexo A).

As informações referentes às características clínicas, patológicas, exames de imagens, bem como, as informações sobre o tratamento e o seguimento dos pacientes necessárias para o estudo, operados entre 2000 e 2006, foram coletadas por meio de revisão dos prontuários provenientes do serviço de arquivo médico (SAME) do A.C.Camargo Cancer Center. A partir de 2007 as informações passaram a ser obtidas do prontuário eletrônico da instituição (sistema MV2000®), nos computadores da mesma instituição, com uso de uma ficha padronizada e confeccionada especificamente para o estudo, seguido pela confecção de um banco de dados específico para o estudo (Anexo B), respeitando os critérios de inclusão e exclusão.

3.3 Critérios de inclusão

- Pacientes tratados pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do A.C.Camargo Cancer Center;
- Diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma papilífero de tireoide;
- Pacientes sem história prévia de tratamento de câncer de tireoide;
- Ausência de radioterapia cervical prévia;
- Tratados com cirurgia com intenção curativa; e
- Paciente com informações de seguimento até a recidiva ou término do período do estudo.

3.4 Critérios de exclusão

- Pacientes admitidos para tratamento de resgate após recidiva de tratamento realizado em outra instituição;
- Pacientes com recidiva loco-regional irresssecável (sem confirmação histológica);
- Pacientes com metástase à distância ao diagnóstico;
- Pacientes com recidiva bioquímica, sem sítio identificável de recidiva;
- Pacientes com menos de 2 anos de seguimento após recidiva;
- Presença de neoplasias malignas sincrônicas; e
- Ausência de material adequado para a realização de imunoistoquímica.

O primeiro grupo (grupo casos) foi formado por todos os pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide que apresentaram recorrência tumoral loco-regional e foram submetidos a tratamento cirúrgico de resgate até 2 anos antes do fechamento do estudo. O segundo grupo (grupo controle) foi formado por pacientes que não apresentaram recorrência loco-regional. Os dados do grupo

controle foram pareados com os do grupo caso de acordo com idade, gênero, estadiamento T e N e tratamento inicial realizado. Todos os pacientes foram re-estadiados de acordo com o Sistema TNM da UICC 7ª Edição ⁹⁴, porém, como houve uma atualização do sistema TNM durante a realização do estudo optamos por acrescentar, o valor de corte para idade de 55 anos⁴⁰. Os pacientes também foram submetidos à estratificação de risco da ATA²². O seguimento dos pacientes nos primeiros dois anos era feito com consultas de 4/4 meses, onde era realizado exame físico e realização de exames laboratoriais (tireoglobulina, anti- tireoglobulina, TSH, T4 livre) e de imagem (us cervical); a partir de dois anos o seguimento era feito semestralmente e após cinco anos, anualmente. RX tórax era solicitado anualmente. Consideramos perda de seguimento quando o paciente não retornou em consulta marcada no dobro do período estipulado.

As amostras dos pacientes selecionados para a análise de imunoistoquímica tiveram seus materiais [(tecido emblocado em parafina e lâminas coradas em H&E, através da técnica de tissue microarray (TMA)] resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. As análises das lâminas em H&E foram realizadas por um único patologista treinado (Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto) que fez a revisão do diagnóstico histopatológico de todos os casos de acordo com a classificação da OMS (2005) ⁹⁵ e a seleção das áreas representativas do tumor, para confecção de lâminas para as análises imunoistoquímicas.

O grupo casos teve amostras analisadas do tumor (caso T) e da recidiva (caso R).

3.5 Casuística

Durante o período analisado, foram realizadas 2.140 tireoidectomias pela equipe de cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do A.C.Camargo Cancer Center em pacientes portadores de neoplasia maligna de tireoide. Dos quais 1.743 tireoidectomias foram realizadas em pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma papilífero. No entanto, na análise inicial dos prontuários 483 foram

excluídos por não apresentarem critérios de elegibilidade (Figura 1). Dos 1260 pacientes remanescentes, 82 pacientes (6,5%) apresentaram recorrência da doença e foram selecionados para compor o grupo de casos, porém 40 pacientes foram excluídos por diversos fatores por não se enquadrarem nos critérios de inclusão, restando 42 pacientes com as informações clínicas de tratamento e o material adequado pra a análise imunoistoquímica necessária, constituindo o grupo de estudo (grupo caso). Na Figura 1 encontra-se demonstrados os diversos fatores que definiram o grupo de estudo.

Figura 1 - Diagrama consort de grupo de seleção dos pacientes

Entre os 42 pacientes do grupo de estudo, 30 pacientes (71,4%) era do gênero feminino e 12 (28,6%) do gênero masculino, com a idade variando entre 10 e 80 anos, com mediana de 39 anos e uma média 40,8 anos (desvio padrão 13,4 anos)

(Tabela 1).. Nenhum paciente apresentou história prévia de exposição a radiação. História familiar de neoplasia tireoideana foi identificada em cinco pacientes (11,9%). Tumor metacrônico foi evidenciado em dois (4,8%) pacientes (pulmão e mama)

Todos os 42 pacientes do grupo de casos foram tratados inicialmente com tireoidectomia total. Esvaziamento cervical seletivo do nível VI, uni ou bilateral foi realizado em 20 pacientes (47,6%), e 3 pacientes (7,1%) foram submetidos também ao esvaziamento dos níveis cervicais laterais (II-V) além do nível VI. A radioiodoterapia adjuvante foi realizada em 35 pacientes (83,3%) (Tabela 1).

A análise histopatológica do tecido extraído dos 42 pacientes, classificou 33 (78,6%) como variante clássica e 9 (21,4%) como variante folicular. O tamanho dos tumores variou de 2 a 50mm, com mediana de 12mm e média de 14,7mm. Multifocalidade foi detectada em 18 (42,9%) dos pacientes e extensão extra-tireoideana em 16 (38,1%). Metástase linfonodal foi confirmada no exame histopatológico em 21 pacientes (50%), sendo 18 pacientes com metástase em nível VI e três pacientes com metástase lateral ipsilateral (linfonodos dos níveis II a V). A maioria dos pacientes (64,3%) tinha tumores com estadiamento T inicial (T1-T2). Metade da casuística foi classificada como baixo risco, segundo a estratificação da ATA²². Dezesete pacientes (40,5%) foram classificados como risco intermediário e quatro pacientes (9,5%) foram classificados como alto risco. Nenhum paciente da casuística apresentou metástase a distância no exame de pesquisa de corpo inteiro após a radioiodoterapia adjuvante (Tabela 1).

O grupo controle foi formado por 42 pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide tratados no mesmo período e pareados de acordo com o gênero, idade e estadiamento patológico T e N. Nesse grupo, história familiar de neoplasia tireoideana foi identificada em seis pacientes (14,3%). Tumor metacrônico foi evidenciado em dois pacientes (4,8%) (SNC e mama). Metástase linfonodal esteve presente em 17 (40,4%) dos pacientes, sendo 15 pacientes com metástase em nível VI e dois pacientes com metástase em grupos linfonodais laterais (níveis II a V) ipsilateral. Nesse grupo, a maior parte dos pacientes (95,2%) foram tratados com tireoidectomia total. Dois pacientes (4,8%) foram submetidos a tireoidectomia

parcial. A análise anatomopatológica destes 42 pacientes do grupo controle demonstrou 33 pacientes (78,6%) como carcinoma papilífero variante clássica, 5 (11,9%) como variante folicular, 2 (4,8%) como variante oncocítica e 2 (4,8%) como variante células de Hurthle. O tamanho dos tumores variou de 2 a 80 mm, com mediana de 10 mm e média de 13,6 mm. Multifocalidade esteve presente em 13 (31,0%) dos pacientes e extensão extratireoideana em 11 (26,2%). Metástase linfonodal foi confirmada no exame anatomopatológico em 17 pacientes (40,5%) (Tabela 1).

Avaliando a casuística do grupo controle pela classificação de risco da ATA, trinta pacientes (71,4%) foram classificados com baixo risco, nove (21,4%) foram classificados com risco intermediário e três (7,1%) foram classificados como alto risco. Nesse grupo, a radioiodoterapia adjuvante foi realizada em 33 pacientes (78,6%). Nenhum paciente apresentou recidiva durante o período de seguimento (Tabela 1).

Tabela 1- Características clínico-patológicas dos casos e controles selecionados

Variável	Categorias/ Medidas	Casos N (%)	Controle N (%)	<i>p</i>
Idade (anos)	Variação Mediana	10-80 39	14-77 39	0,659
Gênero	Feminino Masculino	30 (71,4) 12 (28,6)	30 (71,4) 12 (28,6)	1,000
Tamanho do nódulo	Variação Mediana	2-50 mm 12 mm	2-80 mm 10 mm	0,669
Multifocalidade	Sim Não	18 (42,9) 24 (57,1)	13 (31) 29 (69)	0,366
Extensão Extratireoideana	Sim Não	16 (38,1) 26 (61,9)	11 (26,2) 31 (73,8)	0,350
Invasão Vascular Sanguínea (IVS)	Sim Não	2(4,8) 40 (95,2)	0 (0) 42 (100)	0,494
Invasão Vascular Linfática (IVL)	Sim Não	4 (9,5) 38 (90,5)	2 (7,1) 39 (92,9)	1,000
Invasão Perineural (IPN)	Sim Não	3 (7,1) 39 (92,9)	0 (0) 42 (100)	0,241
Estadiamento T Patológico(TNM 7 ^o Ed)	pT1-T2 pT3-T4	27 (64,3%) 15 (35,7%)	27(64,3%) 15 (35,7%)	1,000
Estadiamento N patológico(TNM 7 ^o Ed)	pN0 pN1a pN1b	21 (50) 18 (42,9) 3 (7,1)	25 (59,5) 15 (35,7) 2 (4,8)	0,476
Classificação ATA	Risco Baixo Risco Intermediário Risco Alto	21 (50) 17 (40,5) 4 (9,5)	30 (71,4) 9 (21,4) 3 (7,1)	0,129
Tipo de Cirurgia	Tireoidectomia Total Tireoidectomia Parcial	42 (100) 0 (0)	40 (95,2) 2 (4,8)	0,494
Iodo (I131)	Sim Não	35 (83,3) 7 (16,7)	33 (78,6) 9 (21,4)	0,782
Recorrência	Local Recorrencial Lateral Local + Recorrencial + Lateral Recorrencial + Lateral Sem recorrência	3 (7,1) 10 (23,8) 25 (59,5) 1 (2,4) 3 (7,1) 0 (0)	(0) (0) (0) (0) (0) 42 (100)	0,000

p-valor obtido pelo Teste de Frequências do Qui-quadrado ou Exato de Fisher

3.6 *Tissue Microarray*

Utilizando o dispositivo técnico chamado “*tissue microarray*” (BeecherInstruments, Silver Springs, EUA), as áreas de interesse de cada um dos blocos doadores foram puncionadas com uma agulha de 1,0 mm de diâmetro e os fragmentos cilíndricos obtidos foram transferidos de forma ordenada para o bloco de parafina receptor. Um mapa para identificação detalhada de cada fragmento cilíndrico foi construído em planilha Excel®, permitindo a localização exata de cada caso. O bloco receptor foi construído com fragmentos teciduais representados por amostras de carcinoma papilífero de tireoide no grupo caso e no grupo controle, em duplicata.

O bloco receptor foi submetido a cortes histológicos sequenciais de 4µm de espessura que foram depositados em lâminas de vidro. As lâminas foram embebidas numa camada de parafina para evitar a oxidação e armazenadas num freezer a -20°C. O controle do número de casos avaliáveis foram realizado pela coloração com hematoxilina-eosina de 4 lâminas não sequenciais, em diferentes níveis. Estas lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular (Olympus, BX41, com campo de aumento x100) (Figura 2). O bloco receptor foi considerado esgotado quando mais de 25% das amostras não estavam presentes nos cortes.

3.7 **Análise de Marcadores**

As lâminas preparadas com base nos casos selecionados foram submetidas à coloração por imunoistoquímica pelos marcadores listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Marcadores utilizados neste estudo

Marcadores	Clone	Marca	Diluição
Citoqueratina 19	RCK107	Dako	Anticorpo já pronto pra uso
Ki-67	MIB-1	Dako	1:200
NFκB p105/50	E381 monoclonal de coelho	Abcam	1:100
NFκB p65/50	E379 monoclonal de coelho	Abcam	1:100
Galectina-3	M3/38 monoclonal de rato	LifeSpanBioSciences	1:10
EGFR	H11	BiocareMedicals	Anticorpo já pronto pra uso

As reações para a marcação das amostras foram realizadas de acordo com o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center:

1. Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 2 banhos em Xilol (20 minutos cada), três banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente;
2. Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125°C (30 segundos). Lavagem em água corrente por 5 minutos;
3. Bloqueio da peroxidase endógena: quatro banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 3%, seguidos de lavagem em água corrente e destilada;
4. Incubação das lâminas com anticorpos primários diluídos nos títulos previamente estabelecidos, conforme tabela 1, em tampão de PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% e azida sódica 0,1% por 30 minutos e por 18h a 4°C em câmara úmida, seguida de lavagem em PBS;

5. Incubação das lâminas com *Post PrimaryBlock* (Novolink Max Polymer-LeicaBiosystems) por 30 minutos, seguido de lavagem com PBS;
6. Incubação das lâminas em solução de substrato com cromógeno diaminobenzidine (DAB, Sigma) 5 minutos a 37°C ao abrigo da luz, seguido de lavagem com água corrente e destilada por 3 minutos;
7. Contra coloração com hematoxilina de Harris por 30 segundos, seguido de lavagem com água corrente e destilada;
8. Imersão em água amoniacal, seguido de lavagem com água corrente e destilada;
9. Desidratação das lâminas com álcool e xilol, 30 segundos cada;
10. Montagem das lâminas em Entellanneu (Merck, 1.07961.0100, Darmstadt, Alemanha).

O controle negativo foi obtido através do mesmo tecido analisado, incluído em cada série de colorações imunoistoquímicas, com a omissão do anticorpo primário.

A padronização de interpretação do anatomopatologista levou em consideração a positividade esperada para cada marcador: Citoqueratina 19 mostra positividade citoplasmática, Galectina-3 evidencia positividade citoplasmática e nuclear, Ki-67 positividade nuclear, NFκB positividade citoplasmática e o EGFR evidencia positividade em membrana celular (Figuras 3,4,5 e 6). A ausência de coloração foi considerada inespecífica e negativa.

Os marcadores citoqueratina 19, galectina-3 e NFκB foram analisadas através de um score que classificou a marcação em três categorias: (0) nenhuma marcação celular, (1) <25% positivo, (2) >25% positivo. O Ki-67 e o EGFR foram classificados também em três categorias: (0) nenhuma marcação celular, (1) <10% positivo, (2) >10% positivo^{27, 71, 81}.

Figura 2 - Fotomicroscopia exibindo reações em hematoxilina-eosina (HE). (A) TMA do grupo caso (20x); (B) Carcinoma papilífero (100x)

Figura 3 - Fotomicroscopia exibe reações imunoistoquímicas (A) EGFR, marcação negativa em todo o campo analisado (100x); (B) Galectina-3, marcação citoplasmática forte e difusa (100x)

Figura 4 - Fotomicroscopia exhibe positividade imunoistoquímica com marcação nuclear para Ki-67 (100x). (A) Alto índice de marcação; (B) Baixo índice de marcação

Figura 5- Fotomicroscopia exhibe positividade imunoistoquímica com marcação citoplasmática para CK-19 (100x). (A) Marcação difusa; (B) Marcação focal

Figura 6 - Fotomicroscopia exibindo reações imunoistoquímicas. (A) NFκB p65/50; (B) NFκB p105/50 exibindo marcação forte e difusa (x100)

3.8 Análise Estatística

As informações coletadas foram armazenadas em um banco de dados informatizado confeccionado especificamente para o estudo e a análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico SPSS (Statistical Package for Social Science, SPSS versão 18.0 for IOS).

As variáveis qualitativas categóricas foram apresentadas através de estatística descritivas (números e porcentagens), enquanto as variáveis quantitativas contínuas foram apresentadas por meio da mediana, média e desvio padrão. Para análise da associação da imunoexpressão dos marcadores biológicos (CK-19, Gal-3 e Ki-67) com os aspectos clinicopatológicos dos pacientes, bem como, a comparação entre grupo de casos e controles, foram utilizados o Teste de χ^2 ou o Teste Exato de Fisher quando adequado. Já o teste de McNemar foi utilizado para averiguar as diferenças na comparação entre duas amostras pareadas qualitativas (antes e depois). O teste T de Student foi utilizado para comparação das médias entre as variáveis contínuas, cujas distribuições de normalidade foram confirmadas através do Teste Shapiro-Wilk.

As análises de sobrevida global e livre de doença foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier. O tempo de seguimento foi considerado a partir da data da cirurgia até a data da última informação e, para os casos de óbito, até a data do

falecimento. O período entre a data da cirurgia até ocorrência de recidiva foi considerado para cálculo da probabilidade de sobrevida livre de doença (ou livre de recorrência).

Regressão logística multivariada foi realizada para identificar possíveis associações independentes. Foram incluídos no modelo de regressão todas as associações significantes observadas nas análises univariadas. Valores de odds ratio (OR) foram determinados para investigar a intensidade das associações. Em todos os testes a significância estatística foi determinada para um valor de $p \leq 0,05$.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise de uniformidade entre os grupos caso e controle

Quarenta e dois pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide que apresentaram recorrência loco-regional da doença durante o seguimento formaram o grupo de estudo. Paralelamente, 42 pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide sem recorrência da doença tratados no mesmo período foram selecionados para formar o grupo controle pareados de acordo com o gênero, idade e estadiamento patológico T e N (TNM 7^a ed) ⁹⁴. A Tabela 3 apresenta a análise realizada para verificação de uniformidade entre os grupos.

Tabela 3 - Verificação de uniformidade entre os grupos casos e controle

Variável	Caso n(%)	Controle n(%)	<i>p</i>
Gênero			
Feminino	30 (71,4)	30 (71,4)	1,000
Masculino	12 (28,6)	12 (28,6)	
Idade			
≤ 45 anos	30 (71,4)	29 (69,0)	0,500
> 45 anos	12 (28,6)	13 (31,0)	
Idade			
≤ 55 anos	38 (90,5)	37 (88,1)	0,500
> 55 anos	4 (9,5)	5 (11,9)	
Estadiamento T			
pT1a	16 (38,1)	18 (42,9)	0,971
pT1b	10 (23,8)	8 (19,0)	
pT2	1 (2,4)	1 (2,4)	
pT3	11 (26,2)	12 (28,6)	
pT4	4 (9,5)	3 (7,1)	
Estadiamento T			
pT1-T2	27 (64,3%)	27 (64,3%)	1,000
pT3-T4	15 (35,7%)	15 (35,7%)	
Estadiamento N			
pN0	21 (50,0)	25 (59,5)	0,476
pN1a	18 (42,9)	15 (35,7)	
pN1b	3 (7,1)	2 (4,8)	

p-valor obtido pelo Teste de Frequências do Qui-quadrado ou Exato de Fisher

4.2 Resultado clínico

O tempo de seguimento dos 42 pacientes que compõem o grupo de casos variou de 46 a 194 meses, com um tempo mediano de 117 meses. Já o tempo até a recorrência variou de 2 a 106 meses, com o tempo mediano de 30 meses.

A localização topográfica mais frequente de recorrência loco-regional foi para os linfonodos cervicais da cadeia lateral (níveis II a V) [25 pacientes (59,5%)], seguido por linfonodos cervicais do nível VI [10 pacientes (23,8%)]. Três pacientes (7,1%) apresentaram recidiva em leito tireoideano e três também foi o número de pacientes que apresentaram recidiva cervical lateral (níveis II a V) e paratraqueal (nível VI), simultaneamente. Uma paciente apresentou recidiva no leito tireoideano, cadeia cervical lateral bilateral e nos linfonodos do nível VI.

Todos os pacientes com recorrência foram submetidos a tratamento cirúrgico de resgate de acordo com o sítio da recorrência. Dos três pacientes com recorrência em leito tireoideano, dois precisaram do auxílio do uso do gama probe para identificação de recorrência local, que foram confirmadas no exame de anátomo patológico, sem evidência de comprometimento linfonodal. Uma paciente apresentou recidiva local com invasão para cartilagem cricoide e precisou ser submetida a hemilaringectomia direita, também não houve linfonodos comprometidos na peça. Não houve associação de recidiva loco-regional com metástase a distância.

Quanto a análise anatomopatológica das recorrências, todos mantiveram o diagnóstico de carcinoma papilífero. O número de linfonodos dissecados nos esvaziamentos laterais (níveis II a V) variou de 17-97 (média de 49). O número de linfonodos positivos encontrados na peça variou de 1-10 (média de 3,33).

O número de linfonodos dissecados nos esvaziamentos cervicais do nível VI variou de 3-10 (média de 5,3), com número de linfonodos positivos encontrados na peça variando de 1-3 (média 1,8).

Vinte e oito pacientes (66,7%) foram submetidos radioiodoterapia como complementação do tratamento de resgate com doses variando de 108 a 389 mCi (média de 239,6 mCi). Apenas 1 paciente (2,4%) foi submetido a radioterapia

externa - a paciente com recidiva local que foi submetida a hemilaringectomia direita. Esta paciente já não apresentava captação ao iodo previamente à cirurgia de resgate (teve diagnóstico através de aumento de tireoglobulina e captação local vista no PET-CT). Nenhum paciente do grupo de estudo foi submetido a tratamento quimioterápico.

Quanto ao status ao final do seguimento, foi observado que 39 pacientes (92,9%) encontram-se vivos e sem evidência de doença, 2 pacientes (4,8%) foram a óbito por outras causas [os dois desenvolveram neoplasias em outro sítio (pulmão e mama) e faleceram por complicações destas neoplasias]. Uma paciente encontra-se com doença ativa em cadeia cervical lateral (nova recidiva), porém está gestante e decidiu fazer cirurgia de resgate após puerpério. A paciente segue realizando exames de pré-natal e acompanhamento com equipe de cabeça e pescoço durante este período, não foi observado aumento linfonodal até o momento.

A sobrevida global em 10 anos para o grupo caso foi de 95,2% (Figura 7).

No grupo controle, o tempo de seguimento variou de 51 a 205 meses, com o tempo mediano de 112 meses. Nenhum paciente apresentou recidiva loco-regional. Dois pacientes (4,8%) faleceram por causas não relacionadas ao câncer de tireoide (1 câncer de mama e 1 câncer SNC). A sobrevida global para o grupo controle em 10 anos também foi de 95,2% (Figura 7). Com isso, não houve diferença entre as curvas de sobrevida global entre os grupos caso e controle (Figura 7).

A sobrevida livre de doença no grupo que apresentou recorrência da doença foi de 21,4% em 5 anos (Figura 8).

Figura 7 - Sobrevida Global entre os grupos caso e controle estudados (Método de Kaplan-Meier)

Figura 8 - Sobrevida livre de recorrência dos 42 pacientes com carcinoma papilífero de tireoide incluídos no grupo de casos (Método de Kaplan-Meier)

4.3 Análise da imunoexpressão dos marcadores estudados

Nesse estudo para avaliação da imunoexpressão de marcadores biológicos em carcinoma papilífero de tireoide com recorrência loco-regional da doença foram utilizados os marcadores imunoistoquímicos Galectina-3, Citoqueratina-19, Ki-67, EGFR, NFκB p105/50 e NFκB p65/50. Entre os marcadores analisados não foi evidenciado nenhuma marcação do EGFR, nem no grupo caso, nem no grupo controle. Em contrapartida, os marcadores NFκB p105/50 e NFκB p65/50 foram forte e difusamente imunoexpressos em todos os pacientes de ambos os grupos. Desta forma, esses marcadores foram excluídos da análise por apresentarem marcação uniforme entre os grupos.

Entre os marcadores analisados, foi evidenciada uma associação estatisticamente significativa da imunoexpressão do Ki-67 nos pacientes que apresentaram recorrência da doença, quando comparado com os pacientes do grupo controle ($p=0,007$). Da mesma forma, os pacientes do grupo de casos apresentaram uma imunoexpressão significativamente maior do marcador CK-19 comparado com o grupo controle ($p=0,029$). Por outro lado, quanto a Galectina-3 não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p=0,299$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Imunoexpressão de CK-19, Gal-3 e Ki-67 entre os grupos caso e controle

Marcadores IHQ	Casos (%)	Controle (%)	p^*
CK-19			
Neg	1 (2,4)	8 (19,0)	0,029
<25%	5 (11,9)	3 (7,1)	
>25%	36 (85,7)	31 (73,8)	
Gal-3			
Neg	3 (7,1)	6 (14,3)	0,299
<25%	4 (9,5)	7 (16,7)	
>25%	35 (83,3)	29 (69,0)	
Ki-67			
Neg	14 (33,3)	26 (61,9)	0,007
<10%	25 (59,5)	16 (38,1)	
>10%	3 (7,1)	0 (0)	

* p -valor obtido pelo teste Exato de Fisher

Analisando individualmente a associação de cada marcador com as variáveis clínico e histopatológicas no grupo com recorrência, foi evidenciado que nos pacientes que apresentaram imunexpressão do CK-19 possuíam uma taxa de IVL significativamente menor ($p=0,046$). No entanto, as demais variáveis clínico-patológicas não apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 5).

A imunexpressão da Galectina-3 e do Ki-67 não apresentou nenhuma associação significativa com as variáveis clínico-patológicas (Tabelas 6 e 7).

Tabela 5 - Relação da imunoexpressão da citoqueratina 19 com variáveis clínico-patológicas no grupo caso

Variáveis	Citoqueratina 19 (%)			<i>p</i> *
	negativo	<25%	>25%	
Gênero				
Feminino	0 (0)	4 (9,5)	26 (61,9)	0,260
Masculino	1 (2,4)	1 (2,4)	10 (23,8)	
Idade				
≤ 45 anos	1 (2,4)	4 (9,5)	25 (59,5)	0,723
> 45 anos	0 (0)	1 (2,4)	11 (26,2)	
Idade				
≤ 55 anos	1 (2,4)	5 (11,9)	32 (76,2)	0,692
> 55 anos	0 (0)	0 (0)	4 (9,5)	
Estadiamento T				
T1-T2	1 (2,4)	3 (7,1)	23 (54,8)	0,742
T3-T4	0 (0)	2 (4,8)	13 (31,0)	
Estadiamento N				
N0	1 (2,4)	3 (7,1)	17 (40,5)	0,519
N1	0 (0)	2 (4,8)	19 (45,2)	
Multifocalidade				
Não	0 (0)	3 (7,1)	22 (55,4)	0,504
Sim	1 (2,4)	2 (4,8)	15 (35,7)	
Extensão extratireoideana				
Não	1 (2,4)	3 (7,1)	22 (52,4)	0,729
Sim	0 (0)	2 (4,8)	14 (33,3)	
Invasão Vascular Sanguínea (IVS)				
Não	1 (2,4)	5 (11,9)	34 (81,0)	0,839
Sim	0 (0)	0 (0)	2 (4,8)	
Invasão Vascular Linfática (IVL)				
Não	1 (2,4)	3 (7,1)	34 (81,0)	0,046
Sim	0 (0)	2 (4,8)	2 (4,8)	
Invasão Perineural (IPN)				
Não	1 (2,4)	5 (11,9)	33 (78,6)	0,764
Sim	0 (0)	0 (0)	3 (7,1)	
Classificação ATA				
Risco Baixo	1 (2,4)	3 (7,1)	17 (40,5)	0,655
Risco Intermediário	0 (0)	1 (2,4)	16 (38,1)	
Risco Alto	1 (2,4)	1 (2,4)	3 (7,1)	

**p*-valor obtido pelo teste de associação do Qui-quadrado ou Exato de Fisher

Tabela 6 - Relação da imunexpressão da Galectina-3 com variáveis clínico-patológicas no grupo caso

Variáveis	Galectina-3 (%)			<i>p</i> *
	negativo	<25%	>25%	
Gênero				
Feminino	2 (4,8)	3 (7,1)	25 (59,5)	0,971
Masculino	1 (2,4)	1 (2,4)	10 (23,8)	
Idade				
≤ 45 anos	2 (4,8)	4 (9,5)	24 (57,1)	0,412
> 45 anos	1 (2,4)	0 (0)	11 (26,2)	
Idade				
≤ 55 anos	3 (7,1)	4 (9,5)	31 (73,8)	0,643
> 55 anos	0 (0)	0 (0)	4 (9,5)	
Estadiamento T				
T1-T2	2 (4,8)	3 (7,1)	22 (52,4)	0,888
T3-T4	1 (2,4)	1 (2,4)	13 (31,0)	
Estadiamento N				
N0	3 (7,1)	3 (7,1)	15 (35,7)	0,095
N1	0 (0)	1 (2,4)	20 (47,6)	
Multifocalidade				
Não	1 (2,4)	3 (7,1)	20 (47,6)	0,545
Sim	2 (4,8)	1 (2,4)	15 (35,7)	
Extensão extratireoideana				
Não	2 (4,8)	3 (7,1)	21 (50,0)	0,830
Sim	1 (2,4)	1 (2,4)	14 (33,3)	
Invasão Vascular Sanguínea (IVS)				
Não	3 (7,1)	4 (9,9)	33 (78,6)	0,811
Sim	0 (0)	0 (0)	2 (4,8)	
Invasão Vascular Linfática (IVL)				
Não	2 (4,8)	4 (9,5)	32 (77,2)	0,296
Sim	1 (2,4)	0 (0)	3 (7,1)	
Invasão Perineural (IPN)				
Não	3 (7,1)	3 (7,1)	33 (78,6)	0,323
Sim	0 (0)	1 (2,4)	2 (4,8)	
Classificação ATA				
Risco Baixo	3 (7,1)	2 (4,8)	16 (38,1)	0,326
Risco Intermediário	0 (0)	1 (2,4)	16 (38,1)	
Risco Alto	0 (0)	1 (2,4)	3 (7,1)	

**p*-valor obtido pelo teste de associação do Qui-quadrado ou Exato de Fisher

Tabela 7 - Relação da imunexpressão do Ki-67 com variáveis clínico-patológicas no grupo caso

Variáveis	Ki-67 (%)			<i>p</i> *
	negativo	<10%	>10%	
Gênero				
Feminino	9 (21,4)	19 (45,2)	2 (2,4)	0,726
Masculino	5 (11,9)	6 (14,3)	1 (2,4)	
Idade				
≤ 45 anos	10 (23,8)	18 (42,9)	2 (4,8)	0,982
> 45 anos	4 (9,5)	7 (16,7)	1 (2,4)	
Idade				
≤ 55 anos	14 (33,3)	22 (52,4)	2 (4,8)	0,163
> 55 anos	0 (0)	3 (7,1)	1 (2,4)	
Estadiamento T				
T1-T2	7 (16,7)	18 (42,9)	2 (4,8)	0,387
T3-T4	7 (16,7)	7 (16,7)	1 (2,4)	
Estadiamento N				
N0	6 (14,3)	14 (33,3)	1 (2,4)	0,613
N1	8 (19,0)	11 (26,2)	2 (4,8)	
Multifocalidade				
Não	6 (14,3)	17 (40,5)	1 (2,4)	0,216
Sim	8 (19,0)	8 (19,0)	2 (4,8)	
Extensão extratireoideana				
Não	8 (19,0)	16 (38,1)	2 (4,8)	0,900
Sim	6 (14,3)	9 (21,4)	1 (2,4)	
Invasão Vascular Sanguínea (IVS)				
Não	14 (33,3)	23 (54,8)	3 (7,1)	0,490
Sim	0 (0)	2 (4,8)	0 (0)	
Invasão Vascular Linfática (IVL)				
Não	13 (31,0)	22 (52,4)	3 (7,1)	0,746
Sim	1 (2,4)	3 (7,1)	0 (0)	
Invasão Perineural (IPN)				
Não	13(31,0)	23 (54,8)	3(7,1)	0,879
Sim	1 (2,4)	2 (4,8)	0 (0)	
Classificação ATA				
Risco Baixo	5 (11,9)	15 (35,7)	1 (2,4)	0,380
Risco Intermediário	8 (19,0)	7 (16,7)	2 (4,8)	
Risco Alto	1 (2,4)	3 (7,1)	0 (0)	

**p*-valor obtido pelo teste de associação do Qui-quadrado ou Exato de Fisher

Realizamos análises dos marcadores com tempo de recidiva (≤ 2 anos, entre 2 e 5 anos e > 5 anos) para avaliar se houve correlação entre a imunoexpressão de marcadores e o fator tempo, porém não houve nenhum resultado estatisticamente significativo, conforme descrito abaixo (Tabela 8).

Tabela 8 - Relação da imunoexpressão dos marcadores com o tempo de recorrência

Marcadores IHQ	Tempo de recorrência (%)			<i>p</i> *
	≤ 2 a	2-5	> 5 a	
CK-19				
Neg	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0,612
<25%	1 (2,4)	3 (7,1)	1 (2,4)	
>25%	15 (35,7)	13 (31,0)	8 (19,0)	
Gal-3				
Neg	1 (2,4)	2 (4,8)	0 (0)	0,798
<25%	2 (4,8)	1 (2,4)	1 (2,4)	
>25%	14 (33,3)	13 (31,0)	8 (19,0)	
Ki-67				
Neg	4 (9,5)	8 (19,0)	2 (4,8)	0,334
<10%	11 (26,2)	7 (16,7)	7 (16,7)	
>10%	2 (4,8)	1 (2,4)	0 (0)	

**p*-valor obtido pelo teste de associação do Qui-quadrado ou Exato de Fisher

Foi analisada também, a expressão dos marcadores imunoistoquímicos com a classificação de risco ATA (risco baixo, intermediário e alto), já que é uma classificação bem estabelecida para avaliar risco de recorrência tumoral. No entanto, não observamos que resultado estatisticamente significativo, conforme tabela abaixo (Tabela 9).

Tabela 9 - Relação da expressão dos marcadores com classificação de Risco ATA

Marcadores IHQ	Classificação de Risco ATA (%)			<i>p</i> *
	Baixo	Intermediário	Alto	
CK-19				
Neg	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0,655
<25%	3 (7,1)	1 (2,4)	1 (2,4)	
>25%	17 (40,5)	16 (38,1)	3 (7,1)	
Gal-3				
Neg	3 (7,1)	0 (0)	0 (0)	0,326
<25%	2 (4,8)	1 (2,4)	1 (2,4)	
>25%	16 (38,1)	16 (38,1)	3 (7,1)	
Ki-67				
Neg	5 (11,9)	8 (19,0)	1 (2,4)	0,380
<10%	15 (35,7)	7 (16,7)	3 (7,1)	
>10%	1 (2,4)	2 (4,8)	0 (0)	

**p*-valor obtido pelo teste de associação do Qui-quadrado ou Exato de Fisher

Foi realizada a análise da imunoexpressão dos marcadores no tumor (grupo caso) na cirurgia inicial e na recidiva, no intuito de identificar se houve mudança no seu comportamento biológico, porém, não houve mudança em seu padrão, conforme descrito nas tabelas abaixo (Tabelas 10, 11, 12).

Tabela 10 - Relação da imunoexpressão da Citoqueratina 19 no tumor (T) e na recidiva tumoral (R)

Marcador IHQ	Citoqueratina 19 (R)			<i>p</i>
	Neg	<25%	>25%	
CK-19 (T)				
Neg	0 (0)	0 (0)	1 (2,4)	0,688
<25%	1 (2,4)	1 (2,4)	3 (7,1)	
>25%	2 (4,8)	4 (9,5)	30 (71,4)	

Teste deMcNemar-Bowker

Tabela 11 - Relação da imunoexpressão da Galectina-3 no tumor (T) e na recidiva tumoral (R)

Marcador IHQ	Galectina-3(R)			<i>p</i>
	Neg	<25%	>25%	
Gal-3 (T)				
Neg	0 (0)	0 (0)	3 (7,1)	0,779
<25%	0 (0)	1 (2,4)	3 (7,1)	
>25%	5 (11,9)	4 (9,5)	33 (78,6)	

Teste deMcNemar-Bowker

Tabela 12 - Relação da imunexpressão do Ki-76 no tumor (T) e na recidiva tumoral (R)

Marcador IHQ	Ki-67 (R)			<i>p</i>
	Neg	<10%	>10%	
Ki-67 (T)				
Neg	3 (7,1)	10 (23,8)	1 (2,4)	0,700
<10%	8 (19,0)	14 (33,3)	3 (7,1)	
>10%	0 (0)	2 (4,8)	1 (2,4)	

Teste de McNemar-Bowker

A análise multivariada por regressão logística da imunexpressão dos marcadores Citoqueratina 19, Galectina-3 e Ki-67, entre os grupos caso e controle foi realizada para avaliar risco de recorrência e observamos que a presença da imunexpressão dos marcadores CK-19 e Ki-67 foi fator de risco independente para a recorrência no carcinoma papilífero de tireoide, com intervalo de confiança de 1,14-81,01 para o Ck-19 e de 1,32-7,94 para o ki-67, com “*p*” significativamente estatístico (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise da regressão logística da imunexpressão de CK-19, Gal-3 e Ki-67 entre os grupos caso e controle quanto ao risco de recorrência

Marcadores IHQ	Casos (%)	Controle (%)	<i>Odds Ratio</i>	<i>95%IC</i>	<i>p</i> *
CK-19					
Neg	1 (2,4)	8 (19,0)	1	1,14 - 81,01	0,037
Imunoexpresso	41 (97,6)	34 (81)	9,64		
Gal-3					
Neg	3 (7,1)	6 (14,3)	1	0,50 - 9,31	0,299
Imunoexpresso	39 (92,9)	36 (16,7)	2,16		
Ki-67					
Neg	14 (33,3)	26 (61,9)	1	1,32 - 7,94	0,010
Imunoexpresso	28 (59,5)	16 (38,1)	3,25		

**p*- valor obtido pelo modelo de regressão logística multivariada

Realizamos ainda uma nova estratificação de risco, de acordo com a classificação de risco da ATA e a imunoexpressão do Ki-67 e CK-19, marcadores que se mostraram fator de risco independente para a recidiva no carcinoma papilífero de tireoide, segundo a nossa análise multivariada. Os casos foram reagrupados da forma elucidada nas tabelas 16 e 17. Observamos que para o marcador KI-67, no grupo de casos, 76% dos pacientes classificados como baixo risco ATA foram reclassificados como intermediário após a nova estratificação com a inclusão do marcador. No grupo controle, 3 pacientes classificados como alto risco foram reclassificados como risco intermediário (Tabela 14). Quando analisamos a taxa de recorrência loco-regional após a nova estratificação, observamos que 100% dos pacientes reclassificados como alto risco apresentaram recidiva tumoral (Tabela 16).

Para o marcador CK-19, no grupo de casos, 95,2% dos pacientes classificados como baixo risco ATA foram reclassificados como intermediário após a nova estratificação (Tabela 15). Não houve mudança expressiva ao analisarmos a taxa de recorrência loco-regional após a nova estratificação com este marcador (Tabela 17).

Tabela 14 - Classificação de risco de recorrência incluindo Ki-67

Classificação de Risco	ATA	ATA+Ki-67
Casos		
Risco Baixo	21	5
Risco Intermediário	17	34
Risco Alto	4	3
Controle		
Risco Baixo	30	18
Risco Intermediário	9	24
Risco Alto	3	0

Tabela 15 - Classificação de risco de recorrência incluindo CK-19

Classificação de Risco	ATA	ATA+CK-19
Casos		
Risco Baixo	21	1
Risco Intermediário	17	37
Risco Alto	4	4
Controle		
Risco Baixo	30	8
Risco Intermediário	9	31
Risco Alto	3	3

Tabela 16 - Taxa de recorrência loco-regional entre os pacientes casos e controle após nova estratificação de Risco (ATA+Ki-67)

Classificação de risco ATA+Ki-67		Recidiva loco-regional (%)	
Risco Baixo	ATA baixo/Ki-67-	5/23	(21,73)
Risco Intermediário	ATA baixo/Ki-67+		
	ATA interm/Ki-67+ ou –	34/58	(58,62)
	ATA alto/Ki-67 –		
Risco Alto	ATA alto/Ki-67+	3/3	(100)

Tabela 17 - Taxa de recorrência loco-regional entre os pacientes casos e controle após nova estratificação de Risco (ATA+CK-19)

Classificação de risco ATA+CK-19		Recidiva loco-regional (%)	
Risco Baixo	ATA baixo/CK-19-	1/9	(11,1)
Risco Intermediário	ATA baixo/CK-19+		
	ATA interm/CK-19+ ou –	37/68	(54,4)
	ATA alto/CK-19 –		
Risco Alto	ATA alto/CK-19+	4/7	(57,1)

A análise de sobrevida livre de recorrência de acordo com a imunoexpressão dos marcadores não apresentou significância estatística (Figuras 9, 10 e 11). Como também não apresentou significância a análise entre os pacientes do grupo caso e classificação ATA (Figura 12) e entre os pacientes do grupo caso e a nova classificação com a inclusão do Ki-67 (Figura 13).

Não houve nenhuma morte por câncer na amostra durante o período de seguimento, o que impossibilitou a análise dos marcadores imunoistoquímicos e sobrevida câncer específica ou global.

Figura 9 - Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e imunoexpressão da Citoqueratina-19 (Kaplan-Meier)

Figura 10 - Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e imunopressão da Galectina-3 (Kaplan-Meier)

Figura 11 - Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e imunopressão do Ki-67 (Kaplan-Meier)

Figura 12 - Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e classificação de risco ATA (Kaplan-Meier)

Figura 13 - Comparação da Sobrevida livre de recorrência entre os pacientes do grupo caso e reclassificação de risco ATA com inclusão do Ki-67 (Kaplan-Meier)

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O carcinoma papilífero de tireoide é o subtipo histológico mais comum entre as neoplasias malignas de tireoide, representando cerca de 80-85% dos casos, e apresenta um comportamento biológico indolente na maioria dos casos. O carcinoma bem diferenciado de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum tanto em adultos como em crianças⁹. A idade dos pacientes com recidiva loco-regional de nossa casuística variou de 10 a 80 anos, com mediana de 39 anos. Não há diferenças significativas destes achados quando comparados aos achados da literatura^{19, 21, 28, 32, 96}. Para os pacientes com idade superior a 55 anos os carcinomas bem diferenciados têm pior prognóstico^{19, 28, 32}.

O carcinoma papilífero de tireoide é mais comum em mulheres³⁰. No presente estudo foram incluídas 30 (71,4%) mulheres e 12 (28,6%) homens em cada grupo. Em estudo realizado por Holler *et al.*⁹⁷ analisando 31 pacientes com múltiplas recidivas de carcinoma bem diferenciado de tireoide encontrou-se uma maior prevalência para o sexo feminino (20 casos), no entanto, são os homens que quando acometidos pela neoplasia parecem apresentar pior prognóstico por desenvolver possivelmente uma doença mais agressiva^{10, 29, 31, 32, 38, 98, 99}. Em nosso trabalho, houve predominância de casos do gênero feminino.

Para Ito *et al.*⁹⁹ os fatores gênero masculino e idade ≥ 55 anos, influenciam significativamente de forma negativa na sobrevida livre de doença em 10 anos de seguimento. Os mesmos autores em 2010, ao analisarem fatores prognósticos para pacientes com recidiva em região central do pescoço, demonstraram que pacientes com idade acima de 45 anos apresentam pior prognóstico^{30, 99, 100}. Em nosso estudo, não foi possível avaliar o fator gênero e idade como fatores que causassem impacto no prognóstico devido ao pareamento entre os grupos casos e controle.

Nossa casuística apresentou 6,5% de recidiva tumoral, dentro do esperado, pois na literatura relatam-se taxas de 5% a 30%^{26-29, 101}. Talvez nossa taxa de recidiva tão perto da margem inferior do que é descrito na literatura deva-se ao fato de que a maioria dos casos operados eram tumores iniciais (pT1, 61,9%), também

condizente com a mudança significativa no perfil dos casos de carcinoma papilífero nas últimas décadas, com uma diminuição importante no número de tumores avançados tratados ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Tivemos um período de seguimento médio de quase 10 anos (118 meses), o que é importante para uma melhor avaliação, já que trata-se de uma doença de comportamento indolente que pode recidivar em até 10 ou 20 anos após o tratamento inicial ^{105, 106}. Segundo dados da literatura, a maioria das recidivas loco-regionais ocorre nos primeiros 5 anos após o tratamento, dando-se maior atenção aos primeiros 2-3 anos do diagnóstico ^{28, 107, 108}. De fato, nossa casuística confirmou esta cronologia. Nós tivemos um número importante de recidivas precoces (mediana de 30 meses), apesar de todos os paciente terem sido submetidos a exames para estadiamento durante a avaliação inicial, com realização de ultrassonografia cervical pré-operatória para identificação de prováveis metástases linfonodais ocultas ao exame clínico e a maioria deles serem classificados como baixo risco (50%) ou de risco intermediário (40,5%) pela estratificação de risco da ATA. Nossa rotina para o seguimento pós-operatório dos pacientes com neoplasia maligna de tireoide inclui ultrassonografia cervical e dosagem de tireoglobulina e anticorpo antitireoglobulina a cada 4 a 6 meses.

A presença de metástases em linfonodos cervicais para os carcinomas bem diferenciados de tireoide, apesar de ter pouca influência na sobrevida do paciente, está associada a altas taxas de recorrência. Na nossa casuística, metade dos pacientes apresentavam metástases linfonodais detectadas no exame anatomopatológico (pN+), o que poderia explicar um maior risco para o desenvolvimento de recorrência loco-regional, porém não teve correlação significantemente estatística. Esta falta de correlação é justificada pelo fato de que o grupo controle ter sido pareado pelo estadiamento patológico T e N, além de ser pareado pelo gênero e idade, não sendo possível, desta forma, analisar-se o efeito prognóstico relativas a essas características clínicas e patológicas.

Patron *et al.*¹⁰⁹ em estudo retrospectivo, observou que apenas metástase a distância teve um impacto importante na sobrevida doença específica no carcinoma bem diferenciado de tireoide. Ito *et al.*¹⁰⁰ em estudo realizado com uma média de seguimento de 10 anos, mostraram que as taxas de recorrência linfonodal, pulmonar e óssea foram de 7%, 2% e 0,6%, respectivamente, no entanto, apenas a idade do

paciente na descoberta da recorrência e a presença de extensão extratireoideana no tumor primário teve um impacto na sobrevida. A recorrência loco-regional microscópica não apresentou impacto na sobrevida desses pacientes. Nosso estudo também comprovou isto ao observarmos que não houve impacto na sobrevida global desses pacientes, já que não tivemos nenhuma morte relacionada ao carcinoma papilífero de tireoide, apesar das recorrências loco-regionais terem sido diagnosticadas. No entanto, deve-se ressaltar que casos com recorrências irressecáveis não foram incluídos no presente estudo. Ao final de 10 anos de seguimento 95,24% dos nossos pacientes encontravam-se vivos e em bom estado de saúde, demonstrando o benefício do tratamento de resgate cirúrgico quando a doença é ressecável. Palme *et al.*¹⁹ também não encontraram diferenças estatísticas significantes na sobrevida global e específica de doença entre os pacientes submetidos a tratamento inicial com aqueles que apresentassem primeira recorrência.

Fatores que predizem falha de tratamento para o carcinoma bem diferenciado da tireoide estão bem estabelecidos na literatura e eles podem ser divididos em fatores tumorais, fatores do paciente e aqueles relacionados ao tratamento^{12, 14, 19, 25, 31}. Independente do tipo de tratamento instituído, cerca de 5 a 30 % dos pacientes apresentam recidiva de doença, o que pode estar associado a variantes biologicamente mais agressivas desta doença¹¹⁰.

Embora incomum, múltiplas recidivas e óbitos têm sido descritos associados alguns casos de carcinoma papilífero^{102, 103}. No entanto, nenhum grupo de fatores clínicos ou histopatológicos é capaz de demonstrar com exatidão qual ou quais pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide pode ou poderão evoluir com recorrência da doença. De forma que as diversas formas de classificações prognósticas descritas na literatura (TNM, ATA, MACIS, AGES, GAMES, EORTC, entre outros) e utilizadas na prática clínica tem permitido a identificação de grupos de riscos com maior ou menor probabilidade, mas não tem permitido a identificação individual dos pacientes com propensão a recorrência da doença³⁶. Esse fato foi evidenciado em nossa casuística, onde a classificação de risco da ATA foi falha em identificar quais pacientes estariam mais propensos a recorrência, visto que 90,5% dos nossos casos pertenciam ao grupo de risco baixo e/ou intermediário para recorrência tumoral. Pensando nisso, vários pesquisadores têm buscado identificar

intensamente marcadores moleculares que possam, ao lado dos clássicos parâmetros clínicos e histopatológicos, distinguir pacientes com tumores que poderiam evoluir de forma desfavorável daqueles com melhor prognóstico, e assim determinar um tratamento individualizado para cada paciente, minimizando os riscos cirúrgicos e o custo efetivo de cada tratamento^{62, 69, 83-85, 90, 111, 112}.

Assim, no presente estudo procuramos avaliar o impacto da imunoexpressão de marcadores biológicos (Ki-67, CK-19, Galectina-3, EGFR, NF- κ B) em 42 pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide que evoluíram com recorrência da doença durante o período de seguimento. Nossa hipótese é de que a agregação desta informação aos dados referentes a fatores clínico e histopatológicos conhecidos poderia aprimorar a capacidade de prever-se maior ou menor risco de recorrência e, futuramente, baseadas no risco individual, propor diferentes estratégias de tratamento para pacientes com carcinoma papilífero de tireoide.

A citoqueratina 19 é um dos marcadores imunoistoquímicos mais utilizados em neoplasias tireoideanas, em geral não é produzida por células tireoideanas saudáveis, sua presença, portanto, está relacionada com transformação neoplásica. Existe uma sólida evidência na literatura relatando uma positividade fraca para o CK-19 em lesões benignas, mas níveis de expressões variáveis em lesões tireoideanas malignas^{72, 90}. Embora a imunoexpressão do CK-19 tenha sido bem utilizada no diagnóstico diferencial de lesões tireoideanas neoplásicas, seu uso como fator prognóstico ainda não é bem conhecido. No entanto, o CK-19 tem um valor prognóstico bem definido em tumores hepáticos, onde pacientes com forte imunoexpressão para CK-19 apresentam um maior risco de evoluir com um pior prognóstico, caracterizando uma maior agressividade tumoral naqueles com maior expressão deste marcador^{76, 77}. Em nosso estudo, a imunoexpressão de CK-19 foi fortemente expressa e significativamente mais evidentes em pacientes que apresentaram recorrência da doença quando comparado com o grupo controle.

No presente estudo foi evidenciada uma maior imunoexpressão de CK-19 no grupo de casos, em relação ao grupo controle, com significância estatística (Tabela 4). Apenas uma amostra de tumor no grupo de casos não apresentou imunoexpressão para o CK-19, sendo todos os outros expressos, com maioria fortemente expressa.

Paradoxalmente, a maior parte dos pacientes do grupo caso com forte imunexpressão para o CK-19 não apresentou IVL ($p<0,05$). Não encontramos na literatura nenhuma correlação entre IVL e imunexpressão de CK-19 no carcinoma papilífero de tireoide.

Alguns trabalhos reportam a correlação estatística significativa entre o nível da imunexpressão de CK-19 no carcinoma papilífero de tireoide com extensão extratireoideana^{72, 113} e estadiamento pTNM⁷². Estes estudos evidenciam que a alta expressão de CK-19 em células tireoideanas tumorais podem ajudar a identificar um subgrupo de pacientes com risco potencialmente maior para apresentar um pior prognóstico, o que também foi evidenciado em nosso estudo, onde pacientes do grupo caso apresentaram uma maior imunexpressão deste marcador em relação ao grupo controle ($p=0,029$), porém, não encontramos correlação deste níveis com estadiamento e extensão extratireoideana.

A Galectina-3 é superexpressa no carcinoma papilífero de tireoide, sendo largamente usada como marcador diagnóstico para esta doença^{51, 91, 114}, no entanto, poucos estudos tem investigado o uso da imunexpressão da galectina-3 como fator prognóstico no carcinoma papilífero de tireoide, e ainda não se estabeleceu um padrão de imunexpressão. Alguns trabalhos na literatura sugerem que os carcinomas papilíferos de tireoide mais agressivos e invasivos apresentam uma maior probabilidade de superexpressão da galectina-3^{115, 116}. Esta teoria sugere que um aumento da imunexpressão da galectina-3 pode ser facilitador para a progressão tumoral, agindo para modular o crescimento celular e se envolvendo na regulação da apoptose e no risco de metástases^{114, 116}.

Salajegheh *et al.*¹¹⁴ evidenciaram que os casos de carcinoma tireoideano, associados a metástases linfonodais apresentavam maior imunexpressão da galectina-3, além de demonstrarem uma correlação significativa entre os níveis aumentados da expressão de galectina-3 e maior tamanho tumoral, concordando com um outro trabalho na literatura que demonstrou que níveis reduzidos da imunexpressão de galectina-3 em carcinomas papilíferos de tireoide foram observados em tamanhos tumorais menores¹¹⁷.

Türköz *et al.*⁶² rebateram estes achados ao demonstrarem uma menor expressão da galectina-3 nas metástases linfonodais em seus respectivos carcinomas primários, sugerindo que a diminuição da galectina-3 pode afrouxar a conexão de células tumorais com a matriz extracelular, facilitando as propriedades invasivas do câncer. A perda da imunoexpressão da galectina-3 também foi identificada em outros trabalhos, Aratake *et al.*¹¹⁸ estudaram a expressão desta proteína em carcinoma anaplásico com áreas diferenciadas e observaram perda da imunoexpressão da galectina-3 em áreas indiferenciadas quando comparadas com áreas bem diferenciadas residuais, sugerindo um decréscimo da expressão durante a progressão tumoral. Orlandi *et al.*¹¹⁹ encontraram perda da imunoexpressão da galectina-3 em carcinomas de tireoide pouco diferenciados. Kawachi *et al.*⁶⁹ relataram um aumento importante da imunoexpressão da galectina-3 em focos primários de tumores tireoideanos com metástases linfonodais, porém eles observaram uma perda desta imunoexpressão na recorrência linfonodal.

Em nosso estudo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos casos e controles ao analisarmos a imunoexpressão da galectina-3. Lee *et al.*⁵¹ analisaram a imunoexpressão da galectina-3 em carcinoma papilífero de tireoide e associaram com a presença de metástases linfonodais, porém sem associação estatística significativa, resultado também encontrado por Londero *et al.*⁹². A imunoexpressão da galectina-3 também foi analisada por Cvejic *et al.*⁹¹ em microcarcinomas tireoideanos que não relacionaram a expressão desta proteína com o crescimento ou agressividade tumoral. Desse modo, o papel prognóstico da galectina-3 no carcinoma papilífero de tireoide ainda é incerto, diante da falta de uniformidade entre os resultados encontrados nos diferentes trabalhos. A presença da imunoexpressão da galectina-3 nos carcinomas papilíferos que respondem bem ao tratamento inicial, bem como naqueles que evoluem com metástases loco-regionais e, conseqüentemente, apresentam uma pior evolução, pode indicar que este marcador não seria útil para avaliar agressividade tumoral.

Ki-67 é uma proteína ligadora de DNA e está relacionada com proliferação celular, sendo um importante marcador tumoral. Sua alta imunoexpressão é associada com pior prognóstico no câncer de mama e câncer de próstata^{79, 80}. Em tireoide, poucos trabalhos analisam o uso deste marcador como fator prognóstico. Ito

*et al.*⁸³ evidenciaram que o Ki-67 foi um fator prognóstico independente para sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma papilífero de tireoide.

No presente estudo foi evidenciada uma associação significativa entre a presença da expressão para o Ki-67 no grupo que apresentou recidiva, comparado ao grupo controle, onde a maioria não apresentou expressão para este marcador, ou, quando presente, apresentou marcação fraca. Não foi encontrada associação deste marcador com gênero, idade, estadiamento T e N, multifocalidade, extensão extratireoideana, invasão vascular linfática ou classificação de risco ATA.

Tang *et al.*⁸⁵ evidenciaram uma maior imunoexpressão do Ki-67 em carcinomas papilíferos de tireoide >1,0cm e na presença de tireoidite, porém sem relação com multifocalidade, extensão extratireoideana e metástase linfonodal. Zhou *et al.*⁸⁴, por outro lado, evidenciaram uma correlação significativa entre uma maior imunoexpressão do Ki-67 e extensão extratireoideana e metástase linfonodal. Pan *et al.*¹²⁰, em uma meta-análise para avaliação onde 51 estudos foram analisados, evidenciaram que pacientes com maior imunoexpressão do Ki-67 apresentavam uma pior sobrevida. Também observou-se associação com tamanho tumoral, metástase linfonodal e extensão extratireoideana.

Foi feita a análise dos marcadores com o tempo de recorrência, em anos, para observar se houve algum marcador que predizia recidiva mais precoce ou tardia, porém, nenhum deles mostrou significância estatística. Realizamos também a análise destes marcadores com a classificação de risco ATA, também sem resultados estatisticamente significativo. Não encontramos na literatura estudos que correlacionem marcadores imunoistoquímicos com tempo de recidiva, tampouco com alguma classificação de risco para recorrência.

Analizamos a imunoexpressão dos marcadores escolhidos em nossa pesquisa nas amostras tumorais na primeira cirurgia e na recidiva, no intuito de identificar se houve mudança no padrão tumoral, porém, não evidenciamos diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Na literatura, também não foi encontrado estudos que tentam fazer esta correlação, dificultando, desta forma, a confrontação das nossas últimas análises.

Na análise multivariada, observamos em nossa casuística, que a Citoqueratina-19 e o Ki-67 se mostraram como fatores de risco independentes para a recorrência loco-regional no carcinoma papilífero de tireoide. Com isso, pode-se afirmar que estes marcadores podem ser úteis na prática clínica no intuito de prever a recorrência tumoral nos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide.

Como a nossa casuística não se enquadrou na classificação de risco de recorrência da ATA, uma vez que metade dos pacientes foi classificado como baixo risco de recorrência, pensamos em realizar uma reclassificação de risco, incluindo a expressão dos marcadores CK-19 e Ki-67, já citadas anteriormente. Observamos que após a reclassificação a amostra do CK-19 não apresentou mudança em relação à classificação original, porém a amostra do Ki-67 ficou mais condizente com nossos resultados, já que trata-se de uma casuística onde todos os pacientes recorreram. Após a reclassificação apenas 5 pacientes permaneceram como baixo risco de recorrência e 37 pacientes (88,1%) foram classificados como risco intermediário ou alto para recorrência. Com 100% desses pacientes reclassificados como alto risco apresentando recorrência-loco regional. Sugerimos, desta forma, incluir este marcador na análise tumoral pós cirúrgica, no intuito de identificar quais pacientes teriam mais chance de apresentar recorrência tumoral no seguimento oncológico.

Reconhecemos em nosso estudo algumas limitações: o fato de ser caso-controle o limitou parcialmente, uma vez que não pudemos correlacionar a maior parte das variáveis clínicas, epidemiológicas e patológicas com o risco de recidiva, já que os grupos eram uniformes; o fato de a amostra ser pequena talvez tenha sido outro fator limitante para resultados significativos quando correlacionamos as variáveis com os marcadores de imunoistoquímica. Será necessário realização de novos estudos em uma maior amostra independente de pacientes para a confirmação desses achados.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com base no exposto, conclui-se que:

- A imunoexpressão do Ki-67 e Citoqueratina 19 está relacionada com a recidiva loco-regional no carcinoma papilífero de tireoide, sendo esses dois marcadores fatores de risco independente para recorrência tumoral.
- Galectina-3, EGFR e NF- κ B não foram úteis como preditores de recorrência loco-regional no presente estudo.
- A presença da imunoexpressão da Citoqueratina 19 teve associação significativamente estatística com a ausência de invasão vascular linfática.
- Não foi evidenciada associação da imunoexpressão destas proteínas quando comparadas com variáveis clinico-patológicas, como idade, gênero, estadiamento TNM, presença de multicentricidade, extensão extratireoideana, invasão vascular sanguínea, invasão perineural e classificação de risco ATA.
- A combinação da imunoexpressão de Ki-67 pode contribuir para melhorar o valor preditivo da classificação ATA de risco de recorrência, no entanto, estes achados precisam ser confirmados em uma maior amostra independente de pacientes.

7 Anexos

7 ANEXOS

7.1 Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**Hospital
A.C. Camargo**
Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 19 de Março de 2013.

**Ao
Dr. Luiz Paulo Kowalski**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1751/13
"Expressão de marcadores moleculares preditivos de recorrência loco-regional de carcinoma papilífero de tireóide".**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 12/03/2013, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital AC Camargo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Fundação Antonio Prudente – CNPJ/MF N. 60.961.968/0001-06
Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo, SP – 01509-900
Telefone: (11) 2189-5000
www.accamargo.org.br

FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE-HOSPITAL DO
CÂNCER A C CAMARGO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE MARCADORES MOLECULARES PREDITIVOS DE RECORRÊNCIA LOCO-REGIONAL DE CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE

Pesquisador: Luiz Paulo Kowalski

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13651613.9.0000.5432

Instituição Proponente: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 222.404

Data da Relatoria: 12/03/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo de caso-controle retrospectivo incluirá pacientes com carcinoma papilífero de tireóide tratados cirurgicamente com finalidade curativa no período entre janeiro de 1980 e julho de 2012. Para este estudo serão coletadas informações clínicas, patológicas e terapêuticas, por meio de revisão de prontuários e serão utilizados materiais (tecido emblocado em parafina e lâminas coradas em H&E) provenientes do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a expressão de marcadores de imunistoquímicos (CK 19, GAL-3, EGFR, VEGF, Ciclina 1, E-caderina, metaloproteinases, Ki 67, NF-kB) nos casos de carcinoma papilífero de tireóide que apresentaram recorrência loco-regional e comparadas a um grupo controle sem recorrência. Os objetivos são adequados do ponto de vista ético.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

N/A.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Recomendamos a aprovação do projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados ao projeto proposto.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE-HOSPITAL DO
CÂNCER A C CAMARGO

Recomendações:

N/A.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

N/A.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Análise da Comissão de Pesquisa - COPE: Aprovado.

SAO PAULO, 19 de Março de 2013

Assinador por:
Jefferson Luiz Gross
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

7.2 Anexo B - Ficha de registro dos dados

1- Número da ficha:

2- Nome do paciente:

3- RGH:

4- Sexo: 0 - feminino

1- masculino

5- Idade na época do tratamento:

6- Ultrassonografia de tireóide: 0 - não realizada

1 - bócio uninodular

2 - bócio multinodular

7- Tamanho do maior nódulo (índice):

8- Punção aspirativa com agulha fina pré-operatória:

0 - não realizada

1 – benigna

2 – padrão folicular

3 - maligna

4 - insatisfatória

9- Exposição prévia a radiação ionizante:

1 - não

2 - sim

10- Portador de outro cancer

1 - não

2 – sim

11- História familiar de câncer

1 - não

2 - sim

3- tireóide

12- cT_N_M_

13- Data da cirurgia:

14- Tipo de tireoidectomia:

1- tireoidectomia total	2- tireoidectomia parcial
3- tireoidectomia total ampliada	4 – totalização

15 – Esvaziamento cervical:

1- não	2- central	3- lateral

16 – Local do tumor:

1 – Lobo Direito	2 – Lobo Esquerdo
3 – Multicêntrico	4 – Istmo:

17 – Dimensão do maior nódulo

18- Multifocalidade:

1 - não	2 - sim

19 – Extensão Extratireoideana:

1 - não	2 - sim

20 – Invasão Perineural:

1 - não	2 - sim

21 – Invasão Vascular Linfática:

1 - não	2 - sim

22 – Invasão Vascular Sanguínea:

1 - não	2 - sim

23 – pT__N__

24 - Linfonodos nível VI

Removidos:	Comprometidos:
------------	----------------

25- Linfonodos laterais

Removidos: Comprometidos:

26 – Classificação de Risco ATA:

1 - baixo 2 - intermediário 3- alto

27- Iodoterapia adjuvante:

1 - não 2 - sim

28- Dose do I131:

29- NFkBp65 T:

1- positivo 2 - negativo

30- NFkBp105 T:

1- positivo 2 - negativo

31- EGFR T:

1- positivo 2 – negative

32- CK19 T:

0- 0% 1- <25% 2 >25%

33- galectina3 T:

0- 0% 1- <25% 2 >25%

34- ki67 T:

0- 0% 1- <10% 2 >10%

35 - Recidiva:

1- não 2- local 3- nível VI

4- cervical lateral 5 – à distância

36- Tempo follow-up (meses):

37- Intervalo livre de doença (meses):

38- NFkBp65 R:

1- positivo 2 - negativo

39- NFkBp105 R:

1- positivo 2 - negativo

40- EGFR R:

1- positivo 2 – negative

41- CK19 R:

0- 0% 1- <25% 2 >25%

42- galectina3 R:

0- 0% 1- <25% 2 >25%

43- ki67 R:

0- 0% 1- <10% 2 >10%

44- Data do último controle:

45- Status atual:

0 - Vivo sem doença 1 - Vivo com doença

2 - Morte por câncer de tireóide 3 - Morte por outra causa

4 - Perdido de vista (não compareceu às duas últimas consultas de seguimento)

7.3 Anexo C- Artigo

Ki-67 and CK-19 are predictors of locoregional recurrence in papillary thyroid carcinoma

Aline de Oliveira Ribeiro Viana, MD^{1,2*}

João Gonçalves Filho, MD, PhD³

Ana Lúcia Noronha Francisco, DDS, PhD³

Clóvis Antônio Lopes Pinto, MD, PhD⁴

Luiz Paulo Kowalski, MD, PhD³

¹Post Graduate Student in the Oncology Program, Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil

²Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, Heliopolis Hospital, São Paulo, Brazil

³Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

⁴Department of Pathology, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

*Corresponding Author:

Aline de Oliveira Ribeiro Viana

Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology,

Heliopolis Hospital - Rua Cônego Xavier, 276, São Paulo, 04231-030, São Paulo, Brazil.

Telephone: 55-11- 2067 0429

e-mail: alineviana@hotmail.com

Keywords: Thyroid Neoplasms; Immunohistochemistry; Recurrence; Biomarkers, Tumor; Prognosis; Carcinoma, Papillary;

Conflicts of Interest: None

Abstract

Background: Most patients with papillary thyroid carcinoma present a good prognosis; however, recurrence rates and the need of salvage treatment remain a significant problem for 5-40% of patients. Although several risk classifications based on clinicopathological prognostic factors are used, it is not possible to predict which patients will have a higher risk of recurrence. **Objective:** To analyze the impact of cytokeratin-19 and Ki 67 immunoexpression as predictive markers of the risk of recurrence in papillary thyroid carcinoma. **Methods:** This is a retrospective case-control study, including 42 patients with papillary thyroid carcinoma and 42 controls. The groups were matched by gender, age and pathological staging T and N. Slides were made by the microarray tissue system. Multivariate logistic regression was applied to identify an independent risk factor for recurrence. **Results:** Of the 42 selected cases, 30 patients (71.4%) were female and 12 (28.6%) were male, ranging in age from 10 to 80 years (median of 39 years). Most patients (64.3%) had tumors at initial T staging (T1-T2). Half of the sample was classified as low risk according to the American Thyroid Association (ATA) risk stratification. Follow-up time ranged from 46 to 196 months, with time to recurrence from 2 to 106 months (median, 30 months). CK-19 and Ki-67 immunoexpression had a statistically significant association with the risk of recurrence ($p = 0.029$ and $p = 0.007$, respectively). In multivariate logistic regression analysis, immunoexpression for these markers was an independent risk factor for locoregional recurrence (OR- 9,64; CI-1.14-81.01 and OR-3,21; CI-1.32-7.94, respectively). **Conclusion:** The immunohistochemical analysis of the Ki-67 and CK-19 markers is useful to predict tumor recurrence in patients with papillary thyroid carcinoma.

Introduction

Papillary carcinoma is the most common well-differentiated thyroid carcinoma, corresponding to more than 80% of the cases. It usually has a slow growth rate and can metastasize to cervical lymph nodes without interfering, however, in overall survival rates¹⁻⁴. In most series of patients with papillary thyroid carcinomas, the reported specific disease survival rate is up to 98% and 93% at 5 and 10 years, respectively. However, in long-term follow-up, the recurrence rate is about 28%⁵.

Several clinical and pathological features have been shown to predict the more aggressive behavior of thyroid carcinoma, but the most useful prognostic factors in well-differentiated thyroid carcinoma are patient age, tumor size, tumor invasion, presence of distant metastasis and tumor dedifferentiation⁶. However, a significant number of cases without these characteristics can present locoregional recurrences. Thus, predicting outcomes in thyroid neoplasms is not reliable using just clinicopathological information.

In order to search for new tools to improve our ability to predict which patients will have a better or worse outcome, immunohistochemical analyzes (IHC) have been used to evaluate different markers in papillary thyroid carcinoma, both as a diagnostic tool and as a prognostic factor⁷. Cytokeratin-19 (CK-19) and Ki-67 are some of the markers used in prognostic evaluation in papillary thyroid carcinoma^{6, 8-11}. Currently, Ki-67 is regarded as one of the most promising markers for assessing cell proliferation activity. In clinical practice, it is used to estimate the prognostic factor in several different malignant tumors, such as mammary, thyroid and neurological tumors¹⁰. In thyroid neoplasms, there are studies that analyze both the diagnostic and prognostic value of this marker. Dwivedi et al.¹² analyzed the expression of Ki-67 and evidenced a greater expression of this marker in papillary thyroid carcinomas in relation to non-neoplastic lesions. Miyauchi et al.¹³ found that Ki-67 was an independent prognostic factor for disease-free survival.

Ck-19 is present in the simple or glandular epithelium; however, an enhanced immune expression is evidenced in some pathological conditions, as in tumors of epithelial

origin. It is a sensitive marker for papillary carcinomas, usually with a strong diffuse plasma reactivity, while in benign thyroid lesions and normal thyroid tissue, a focal and light reactivity is observed^{14, 15}. Cheung et al.¹⁴ demonstrated diffuse immune reactivity in 66% of papillary thyroid carcinomas. While the significance of CK-19 immunorexpression for differential diagnosis of thyroid lesions has been widely used and debated, its value as a prognostic factor in papillary carcinoma is still uncertain. In hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma, it is well recognized that patients with immunorexpression for CK-19 have a worse prognosis, with the level of immunorexpression significantly related to tumor aggressiveness and postoperative recurrence^{16, 17}.

Most studies that investigate immunohistochemical markers for papillary thyroid carcinoma do so in order to differentiate between benign and malignant neoplasms, as few studies are looking for prognostic markers^{6, 8, 10, 11}. The aim of this study was to analyze the impact of the immunorexpression of CK-19 and Ki-67 on the risk of patients with papillary thyroid carcinoma.

Material and Methods

This is a retrospective case-control study including patients with thyroid papillary carcinoma surgically treated for curative purposes from January 1, 2000 to July 31, 2010. The case group was formed by all patients who presented locoregional tumor recurrence and underwent surgical salvage treatment. The control group was formed by patients who did not present locoregional recurrence. Data from the control group were matched with those from the case group according to age, gender and T and N staging. Exclusion criteria were: 1) patients submitted to initial treatment or salvage treatment at another institution; 2) patients with unresectable locoregional relapse; 3) patients with only distant recurrence; 4) patients with biochemical relapse, with no identifiable site of recurrence; 5) records with incomplete information about the disease; 6) patients with less than two years post-recurrence follow-up; 7) loss of follow-up was considered when the patient did not return on a scheduled appointment twice in the stipulated period.

All patients had the tumors staged according to the American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis (TNM) staging system (7th edition)¹⁸. The case group had analyzed samples of the initial tumor and also the specimen of the salvage surgery. The control group had only the specimen of the primary surgery analyzed. The study was evaluated and approved by the Research Ethics Committee of the A.C. Camargo Cancer Center. All demographic, clinical, pathological and therapeutic information were collected from the electronic medical records from the A.C. Camargo Cancer Center by a single investigator (AORV), using a standardized form.

The TMA Block was constructed using 1.0mm diameter samples of representative of each tumor tissue taken from the recipient paraffin block, with papillary thyroid carcinoma samples in the case group at initial ($n=42$) and relapse ($n=42$) and in the control group ($n=42$). All specimens were collected in duplicate. The slides were stained by IHC by CK-19 (Clone RCK107, Dako), Ki-67 (Clone MIB-1, Dako). The reaction for labeling the samples was performed by dewaxing and hydrating the histological sections, with subsequent antigenic recovery in the pressure chamber in Citrate solution (pH 6.0). Exposure to hydrogen peroxide 3% for 5 min; incubation of the slides with primary antibodies diluted in previously established titers in PBS buffer; Incubation of the slides with Post Primary Block (Novolink Max Polymer-Leica Biosystems) for 30 minutes; Incubation of slides in substrate solution with chromogen diaminobenzidine (DAB, Sigma) 5 minutes; Fractionation with Harris hematoxylin for 30 seconds, followed by washing with distilled tap water; Assembly of the slides in Entellan neu (Merck, 1.07961.0100, Darmstadt, Germany). The negative control was obtained through the same tissue analyzed, included in each series of immunohistochemical staining, with the omission of the primary antibody. The standardization of pathological interpretation took into account the expected positivity for each marker: Cytokeratin 19 shows cytoplasmic positivity and Ki-67, nuclear positivity. The

absence of staining was considered nonspecific and negative. Cytokeratin-19 was analyzed by a score that classified the labeling in three categories: (0) no cell marking, (1) <25% positive, (2) > 25% positive. Ki-67 was also classified into three categories: (0) no cell marking, (1) <10% positive, (2) > 10% positive.

The information collected was stored in a computerized database made specifically for the study and statistical analysis was performed using SPSS (Statistical Package for Social Science, SPSS version 18.0 for IOS) statistical software. The categorical qualitative variables were presented through descriptive statistics (numbers and percentages), while the continuous quantitative variables were presented by means of the median, mean and standard deviation. For the analysis of the association of immunoexpression of biological markers (CK-19 and Ki-67) with the clinicopathological aspects of the patients, as well as the comparison between cases and controls, the χ^2 Test or the Test Fisher exact when appropriate, were used. The McNemar test was used to ascertain the differences in the comparison between two paired qualitative samples (before and after). The T Student's test was used to compare the means between the continuous variables, whose normality distributions were confirmed through the Shapiro-Wilk Test.

Overall and disease-free survival analyzes were performed using the Kaplan-Meier method. The follow-up time was considered from the date of surgery until the date of the last information and, in the cases of death, until the date of death. The period between the date of surgery and the occurrence of relapse was considered to calculate the probability of disease-free (or recurrence-free) survival.

Multivariate logistic regression was performed aiming to identify possible independent associations. All the significant associations observed in the univariate analyzes were included in the regression model. Odds ratio (OR) values were determined to investigate the intensity of associations. In all tests the statistical significance was determined for a value of $p \leq 0.05$.

Results

During the 10 years analyzed, 2140 thyroidectomies were performed for thyroid carcinoma in the institution, in which, 1743 were histologically diagnosed as papillary thyroid carcinoma. Cases with incomplete clinical or pathological information (178) or that were lost to follow-up (305) were excluded. Of the remaining cases, 82 presented recurrence, but 40 cases had to be excluded because they did not fit the inclusion criteria. At the end of this process, 42 cases were obtained with all clinical information on treatment and follow-up present, as well as paraffin blocks suitable for the available immunohistochemical analysis.

The clinical characteristics of cases and control groups are described in Table 1. The follow-up time of the 42 patients in the study group ranged from 46 to 194 months (median, 117 months). The time to recurrence ranged from 2 to 106 months (median, 30 months). Site of locoregional recurrence was for the lateral chains of cervical lymph nodes [25 patients (59.5%)], followed by cervical lymph nodes of the central compartment [10 patients (23.8%)]. Three patients (7.1%) presented recurrence in the thyroid bed and three were also the number of patients who presented local and lateral recurrences simultaneously. One patient presented recurrence in the thyroid bed and bilateral lateral lymph nodes.

All patients with recurrence were submitted to salvage surgical treatment according to the site of recurrence. Of the three patients with recurrence in the thyroid bed, two required the use preoperative radioactive technetium injection and a probe for identification of local recurrence, which was confirmed in the pathological examination, with no evidence of lymph node involvement. One patient had local recurrence with invasion of the cricoid cartilage and underwent right vertical hemilaryngectomy. There were also no lymph nodes involved in the specimen. There was no association of locoregional recurrence with distant metastasis.

As for the pathological analysis of the recurrences, all confirmed the diagnosis of papillary carcinoma. The number of lymph nodes dissected in lateral neck dissections (levels

II to V) ranged from 17-97 (mean of 49 lymph nodes). Positive lymph nodes found in the specimen ranged from 1-10 (mean of 3.3 lymph nodes). The number of lymph nodes dissected in the central compartment dissections (level VI) ranged from 3-10 (mean of 5.3 lymph nodes), with positive lymph nodes found in the specimen ranging from 1-3 (mean of 1.8 lymph nodes).

Twenty-eight patients (66.7%) underwent adjuvant radioiodine therapy with doses varying from 108 to 389mCi (mean of 239.6mCi). Only the patient that underwent partial laryngectomy was submitted to adjuvant teloradiotherapy. This patient had no previous iodine uptake prior to salvage surgery (diagnosed through increased thyroglobulin and local uptake seen in PET-CT). No patient in the study group underwent chemotherapy.

Regarding the status at the end of the follow-up, 39 patients (92.9%) were alive and without evidence of disease, 2 patients (4.8%) died due to other causes (the two had second primary tumors - lung and breast - and died from complications of these neoplasms]. One female patient had recurrent disease in the lateral cervical levels (new relapse), but she was pregnant and decided to undergo salvage surgery after puerperium. The patient continues regular prenatal and follow-up examinations and no lymph node increase has been observed so far.

Overall survival at 10 years for the case group was 95.2% (Figure 1). In the control group, follow-up ranged from 51 to 205 months, with a median time of 112 months. No patient presented locoregional recurrence. Two patients (4.8%) died due to causes not related to thyroid cancer (1 breast cancer and 1 CNS cancer). Overall survival for the control group at 10 years was also 95.2%. Disease-free survival in the group that presented recurrent disease was 21.4% at 5 years.

There was a significant association between the presence of higher Ki-67 expression in the group that presented relapse, compared to the control group, where the majority did not present expression for this marker or, when present, it was classified as weak ($p=0.007$). Similarly, CK-19 was immunoexpressed in both, but in the case group, a greater number of patients with higher grades of immunoexpression were shown ($p=0.029$) (Table 2).

There was no significant association among clinical and histopathological variables (gender, age, staging, multifocality, extrathyroidal extension, blood vascular invasion, perineural invasion and ATA risk classification). There was a significant association between CK-19 immunoexpression and lower LVI rate ($p=0.046$). Ki-67 immunoexpression showed no significant association with the same clinicopathological variables (data not shown).

The multivariate analysis by logistic regression of immunoexpression of the cytokeratin-19 and Ki-67 markers, showed that the presence of immunoexpression of CK-19 and Ki-67 markers were significant independent predictors of the risk of recurrence, with a confidence interval of 1.14-81.01 for Ck-19 and 1.32-7.94 for ki-67 (Table 3). There was no significant association between ATA classification and CK19 or Ki-67 immunoexpression (Table 4).

We also performed an analysis combining risk stratification according to ATA and Ki-67 immunoexpression. The cases were reassembled as follows: a) low risk: patients classified as low risk ATA / Ki-67-; b) Intermediate risk: patients with low risk ATA / Ki-67+, intermediate risk ATA / Ki-67- or + and high risk ATA / Ki-67-; c) high risk: patients high risk ATA / Ki-67+. We observed that in the group of cases, 76% of the patients classified as low ATA risk were reclassified as intermediate after the new stratification with the inclusion of Ki-67. In the control group, 3 patients classified as high risk were reclassified as intermediate risk. When we analyzed the locoregional recurrence rate after the new stratification, we observed that 100% of patients reclassified as high risk presented tumor recurrence (Table 5).

Discussion

Papillary thyroid carcinoma is the most common histological subtype among malignant thyroid neoplasms, and usually has an indolent clinical course in most cases. In our study, we had a 6.5% rate of tumor recurrence, consistent with the literature reporting rates of 5-30%^{19,20}. The follow-up period in this series was almost 10 years (118 months), which is necessary for proper evaluation because of the indolent tumor behavior^{21, 22}. Possibly our low rate of relapse, close to the lower margin described in the literature, can be due to the fact that the majority of operated cases were pT1 (61.9%), also consistent with the significant change in the profile of cases of papillary carcinoma in the last decades, with a significant decrease in the number of advanced tumors treated^{23, 24}. Despite this, we had a significant number of early recurrences (median of 30 months), although all patients were staged during the initial evaluation with preoperative cervical ultrasonography to identify probable lymph node metastases and most of them were classified as low risk (50%) or intermediate risk (40.5%) by ATA risk stratification.

Although uncommon, relapses and deaths have been reported associated with some cases of papillary thyroid carcinoma^{23, 24}. Several clinical or histopathological prognostic factors are predictors of survival (TNM, ATA, MACIS, AGES, GAMES, EORTC, among others) and are not predictors of risk recurrence in patients with papillary carcinoma²⁵. With this in mind, several authors have sought to identify molecular markers that could, in addition to the classic clinical and histopathological parameters, distinguish low and high risk patients for recurrences aiming to minimize the risk of overtreatment for low-risk patients^{9-11, 26-30}.

In 2009, ATA published a risk stratification for patients with well differentiated thyroid carcinoma undergoing thyroidectomy, in order to select those patients with a higher risk of recurrence and / or disease persistence. Classified in three categories: low risk, intermediate risk and high risk of recurrence. Low-risk patients were defined as having intrathyroidal DTC with no evidence of extrathyroidal extension, vascular invasion, or metastases. Intermediate-risk patients demonstrated either microscopic extrathyroidal extension, cervical lymph node metastases, RAI-avid disease in the neck outside the thyroid bed, vascular invasion, or aggressive tumor histology. High-risk patients had gross extrathyroidal extension, incomplete tumor resection, distant metastases, or inappropriate postoperative serum Tg values. In our series, we were unable to identify those patients at greater risk for tumor recurrence, since 90.5% of the cases belonged to the group of low and / or intermediate risk of recurrence.

We evaluated the immunoexpression of two biological markers (Ki-67 and CK-19) in 42 patients with papillary thyroid carcinoma who evolved with locoregional recurrences during the follow-up period. Cytokeratin-19 is one of the most widely used immunohistochemical markers for thyroid neoplasms, and is not usually produced by healthy thyroid cells. Its presence is therefore related to neoplastic transformation. There is strong evidence in the literature reporting a weak positivity for CK-19 in benign lesions, but levels of variable expression in malignant thyroid lesions^{6, 28}. Although CK-19 immunoexpression has been well used in the differential diagnosis of neoplastic thyroid lesions, its use as a prognostic factor is still not well known. However, CK-19 has a well-defined prognostic value in liver tumors, where patients with strong immunoexpression for CK-19 have a higher risk of developing with a worse prognosis, characterizing greater tumor aggressiveness in those with higher expression of this marker^{16, 17}. In the case of thyroid neoplasms, there is little information about the carcinogenic role of CK-19 or its value as a prognostic factor^{6, 28}. In our study, the immunoexpression of CK-19 was strongly expressed and significantly more evident in patients who presented recurrence of the disease when compared to the control group. Only one case in the sample did not have immunoexpression for CK-19. Paradoxically, most patients in the case group with strong immunoexpression for CK-19 did not present lymphatic vascular invasion ($p < 0.05$). We did not find in the literature any correlation between IVL and CK-19 immunoexpression in papillary thyroid carcinoma.

Some studies report a statistically significant correlation of the level of CK-19 immunoexpression in thyroid papillary carcinoma with extrathyroidal extension and pTNM staging⁶. These studies demonstrate that the high expression of CK-19 in tumor thyroid cells the higher risk patients to present a worse prognosis, which was also evidenced in our study; however, we did not find correlation of these levels with staging and extrathyroidal extension.

Ki-67 is a DNA-binding protein that is found primarily in the nucleus and is related to cell proliferation, being an important tumor marker. Its high immunoexpression is associated with worse prognosis in breast cancer and prostate cancer^{31, 32}. In thyroid, few studies analyzed the use of this marker as a prognostic factor. Ito et al.⁹ evaluated this marker and demonstrated that Ki-67 was an independent prognostic factor for disease-free survival in patients with papillary thyroid carcinoma. In the present study, there was a significant association between the presence of Ki-67 expression in the group that presented recurrence, compared to the control group, where the majority did not present expression for this marker or, when present, presented weak immunoexpression. No association was found for this marker with gender, age, T and N staging, multifocality, extrathyroidal extension, lymphatic vascular invasion or ATA risk classification.

Tang et al.¹¹ showed a higher immunoexpression of Ki-67 in papillary thyroid carcinomas >1.0cm and in the presence of thyroiditis, but without relation with multifocality, extrathyroidal extension and lymph node metastasis. Zhou et al.¹⁰, on the other hand, evidenced a significant correlation between increased Ki-67 immunoexpression and extrathyroidal extension and lymph node metastasis. Pan et al.³³ in a meta-analysis for evaluation where 51 studies were included, showed that patients with higher Ki-67 immunoexpression presented worse survival in thyroid cancer. It was also associated with tumor size, lymph node metastasis and extrathyroidal extension.

In the multivariate analysis, we observed in our series that Cytokeratin-19 and Ki-67 were shown to be independent risk factors for locoregional recurrence in papillary thyroid carcinoma. It is therefore suggested that cell proliferative activity in the primary lesion is an important factor reflecting the probability of carcinoma recurrence. Therefore, these markers may be useful in clinical practice in order to predict tumor recurrence in patients with papillary thyroid carcinoma.

The proposed risk classification combining the expression of Ki-67 and ATA classification seems to be a potential of increasing the ability to predict recurrences. In the group of cases, only 5 patients remained at low risk of recurrence and 37 patients (88.1%) were classified as intermediate or high risk for recurrence. All the patients reclassified as high risk presented locoregional recurrences. Therefore, the use of this marker associated to ATA classification must be tested in a larger independent sample to confirm its predictive value on the risk of recurrence.

References

1. 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 Dec;164(6):658-61.
2. Dottorini ME, Vignati A, Mazzucchelli L, Lomuscio G, Colombo L. Differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents: a 37-year experience in 85 patients. *J Nucl Med*. 1997 May;38(5):669-75.
3. Kowalski LP, Gonçalves Filho J, Pinto CA, Carvalho AL, de Camargo B. Long-term survival rates in young patients with thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Jul;129(7):746-9.
4. Liu FH, Kuo SF, Hsueh C, Chao TC, Lin JD. Postoperative recurrence of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis. *J Surg Oncol*. 2015 Aug;112(2):149-54.

5. Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, Weiss RE, Degroot LJ, Simon CA, Embia OM, Angelos P, Kaplan EL, Schechter RB. A study os recurrencee and death from papillary thyroid câncer with 27 years os median follow-up. *Surgery* 2013;154(6):1436-46.
6. Isic Dencic T, Cvejic D, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Savin S. Cytokeratin19 expression discriminates papillary thyroid carcinoma from other thyroid lesions and predicts its aggressive behavior. *Med Oncol.* 2013 Mar;30(1):362.
7. Ruggeri RM, Campennì A, Baldari S, Trimarchi F, Trovato M. What is New on Thyroid Cancer Biomarkers. *Biomark Insights.* 2008 Apr 29;3:237-252.
8. Londero SC, Godballe C, Krogdahl A, Bastholt L, Specht L, Sørensen CH, Pedersen HB, Pedersen U, Christiansen P. Papillary microcarcinoma of the thyroid gland: is the immunohistochemical expression of cyclin D1 or galectin-3 in primary tumour an indicator of metastatic disease?. *Acta Oncol.* 2008;47(3):451-7.
9. Ito Y, Higashiyama T, Takamura Y, Kobayashi K, Miya A, Miyauchi A. Clinical outcomes of patients with papillary thyroid carcinoma after the detection of distant recurrence. *World J Surg.* 2010 Oct;34(10):2333-7.
10. Zhou Y, Jiang HG, Lu N, Lu BH, Chen ZH. Expression of ki67 in papillary thyroid microcarcinoma and its clinical significance. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(4):1605-8.
11. Tang J, Gui C, Qiu S, Wang M. The clinicopathological significance of Ki67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator?. *World J Surg Oncol.* 2018 May 31;16(1):100.
12. Dwivedi SS, Khandeparkar SG, Joshi AR, Kulkarni MM, Bhayekar P, Jadhav A, Nayar M, Kambale NS. Study of Immunohistochemical Markers (CK-19, CD-56, Ki-67, p53) in Differentiating Benign and Malignant Solitary Thyroid Nodules with special Reference to Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Diagn Res.* 2016 Dec;10(12):EC14-EC19.
13. Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M, Ito Y, Kihara M, Higashiyama T, Yabuta T, Masuoka H, Shindo H, Kobayashi K, Miya A. Ki-67 labeling index is a predictor of postoperative persistent disease and cancer growth and a prognostic indicator in papillary thyroid carcinoma. *Eur Thyroid J.* 2013 Mar;2(1):57-64.
14. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 2001 Apr;14(4):338-42.
15. Song Q, Wang D, Lou Y, Li C, Fang C, He X, Li J. Diagnostic significance of CK19, TG, Ki67 and galectin-3 expression for papillary thyroid carcinoma in the northeastern region of China. *Diagn Pathol.* 2011 Dec 21;6:126.
16. Feng J, Zhu R, Chang C, Yu L, Cao F, Zhu G, Chen F, Xia H, Lv F, Zhang S, Sun L. CK19 and Glypican 3 Expression Profiling in the Prognostic Indication for Patients with HCC after Surgical Resection. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151501.
17. Liu LZ, Yang LX, Zheng BH, Dong PP, Liu XY, Wang ZC, Zhou J, Fan J, Wang XY, Gao Q. CK7/CK19 index: A potential prognostic factor for postoperative intrahepatic cholangiocarcinoma patients. *J Surg Oncol.* 2018 Jun;117(7):1531-1539.
18. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, et al., eds. New York: Springer;2009.
19. Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 1998 Jan 29;338(5):297-306.
20. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer.* 2007 Jul 1;110(1):38-46.
21. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head Neck.* 1998;20(1):26-30.
22. Shah JP, Patel SG, Singh B. *Head and neck: surgery and oncology*. St. Louis: Elsevier, Mosby; 2012.

23. Cramer JD, Fu P, Harth KC *et al.* Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results National Cancer Data Registry. *Surgery*. 2010;148:1147-53.
24. Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM *et al.* Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid*. 2011;21(2):125-34.
25. Cushing SL, Palme CE, Audet N, Eski S, Walfish PG, Freeman JL. Prognostic factors in well-differentiated thyroid carcinoma. *Laryngoscope*. 2004 Dec;114(12):2110-5.
26. Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, Sueyoshi K, Aikou T, Sato E. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol*. 2000 Apr;31(4):428-33.
27. Türköz HK, Oksüz H, Yurdakul Z, Ozcan D. Galectin-3 expression in tumor progression and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol*. 2008 Summer;19(2):92-6.
28. Sethi K, Sarkar S, Das S, Rajput S, Mazumder A, Roy B, Patra S, Mohanty B, El-Naggar AK, Mandal M. Expressions of CK-19, NF-kappaB, E-cadherin, beta-catenin and EGFR as diagnostic and prognostic markers by immunohistochemical analysis in thyroid carcinoma. *J Exp Ther Oncol*. 2011;9(3):187-99.
29. Fernandez IJ, Piccin O, Sciascia S *et al.* Clinical significance of BRAF mutation in thyroid papillary cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;148(6):919-25.
30. Landa I, Ganly I, Chan TA *et al.* Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(9):E1562-6.
31. Luporsi E, André F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, Tubiana-Mathieu N, Sigal-Zafrani B, Arnould L, Gompel A, Egele C, Poulet B, Clough KB, Crouet H, Fourquet A, Lefranc JP, Mathelin C, Rouyer N, Serin D, Spielmann M, Haugh M, Chenard MP, Brain E, de Cremoux P, Bellocq JP. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(3):895-915.
32. Shahait M, Nassif S, Tamim H, Mukherji D, Hijazi M, El Sabban M, Khauli R, Bulbul M, Abou Kheir W, El Hajj A. Ki-67 expression predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy in the setting of positive surgical margins. *BMC Urol*. 2018 Mar 5;18(1):13.
33. Pan DH, Wen Dy, Luo YH *et al.* The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6051 cases. *Onco Targets Ther*. 2017;10:3261-76.

Table 1- Clinical-pathological characteristics of selected cases and controls

Variable	Categories/ Measures	Cases N (%)	Control N (%)	<i>p</i>
Age	Variation Median	10-80 39	14-77 39	0.659
Gender	Female Male	30 (71.4) 12 (28.6)	30 (71.4) 12 (28.6)	1.000
Size of node	Variation Median	2-50 mm 12 mm	2-80 mm 10 mm	0.669
Multifocality	Yes No	18 (42.9) 24 (57.1)	13 (31) 29 (69)	0.366
Extrathyroidal Extension	Yes No	16 (38.1) 26 (61.9)	11 (26.2) 31 (73.8)	0.350
Blood Vascular Invasion (BVI)	Yes No	2 (4.8) 40 (95.2)	0 (0) 42 (100)	0.494
Lymphatic Vascular Invasion (LVI)	Yes No	4 (9.5) 38 (90.5)	2 (7.1) 39 (92.9)	1.000
Perineural Invasion (PNI)	Yes No	3 (7.1) 39 (92.9)	0 (0) 42 (100)	0.241
Pathological T Staging	pT1-T2 pT3-T4	27 (64.3) 15 (35.7)	27 (64.3) 15 (35.7)	1.000
Pathological N Staging	pN0 pN1a pN1b	21 (50) 18 (42.9) 3 (7.1)	25 (59.5) 15 (35.7) 2 (4.8)	0.476
ATA Classification	Low Risk Intermediary Risk High Risk	21 (50) 17 (40.5) 4 (9.5)	30 (71.4) 9 (21.4) 3 (7.1)	0.129
Type of Surgery	Total thyroidectomy Partial thyroidectomy	42 (100) 0 (0)	40 (95.2) 2 (4.8)	0.494
Iodine (I131)	Yes No	35 (83.3) 7 (16.7)	33 (78.6) 9 (21.4)	0.782
Recurrence	Local Recurrent Lateral Local + Recurrent + Lateral Recurrent + Lateral Local + Distant Without recurrence	3 (7.1) 11 (26.2) 24 (57.1) 1 (2.4) 2 (4.8) 1 (2.4) 0 (0)	(0) (0) (0) (0) (0) (0) 42 (100)	0.000

p-value obtained by the Chi-Square Frequency Test or Fisher's Exact

Table 2 - Immunoexpression of CK-19 and Ki-67 between the case and control groups

Markers IHQ	Cases (%)	Control (%)	<i>p</i>
CK-19			
Negative	1 (2.4)	8 (19.0)	0.029
<25%	5 (11.9)	3 (7.1)	
>25%	36 (85.7)	31 (73.8)	
Ki-67			
Negative	14 (33.3)	26 (61.9)	0.007
<10%	25 (59.5)	16 (38.1)	
>10%	3 (7.1)	0 (0)	

p-value obtained by Fisher's Exact Test

Table 3 - Logistic regression analysis of CK-19 and Ki-67 immunoexpression between the case and control groups regarding the risk of recurrence

Markers IHQ	Cases (%)	Control (%)	<i>Odds Ratio</i>	<i>95%IC</i>	<i>p</i>
CK-19					
Negative	1(2.4)	8 (19.0)	1	1.14 – 81.01	0.037
Imunoexpress	41(97.6)	34 (81)	9.64		
Ki-67					
Negative	14 (33.3)	26 (61.9)	1	1.32 – 7.94	0.010
Imunoexpress	28 (59.5)	16 (38.1)	3.25		

p-value obtained by Fisher's Exact Test

Table 4 - Relationship of expression of markers with ATA risk Classification

Markers IHQ	ATA risk classification (%)			<i>P*</i>
	Low	Intermediary	High	
CK-19				
Negative	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0,655
<25%	3 (7,1)	1 (2,4)	1 (2,4)	
>25%	17 (40,5)	16 (38,1)	3 (7,1)	
Ki-67				
Negative	5 (11,9)	8 (19,0)	1 (2,4)	0,380
<10%	15 (35,7)	7 (16,7)	3(7,1)	
>10%	1 (2,4)	2 (4,8)	0 (0)	

Table 5 - Locoregional recurrence rate among all patients studied (cases and controls) after a new risk stratification (ATA + Ki-67)

ATA+Ki-67 Risk Classification		locoregional recurrence (%)	
Low Risk	Low ATA /Ki-67-	5/23	(21.7)
Intermediary Risk	Low ATA /Ki-67+		
	Intermediary ATA/Ki-67+ or –	34/58	(58.6)
	High ATA/Ki-67 –		
High Risk	High ATA/Ki-67+	3/3	(100.0)

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 Aug;22(6):395-404.
2. American Cancer Society: Thyroid Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/Cancer/ThyroidCancer/DetailedGuide/thyroid-cancer-key-statistics> (Acesso: 10 abril 2018).
3. Dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf> (Acesso: 18 março 2018).
4. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 Apr;140(4):317-22.
5. Yip L. Molecular markers for thyroid cancer diagnosis, prognosis, and targeted therapy. *J Surg Oncol*. 2015 Jan;111(1):43-50.
6. Vaccarella S, Dal Maso L, Laversanne M, Bray F, Plummer M, Franceschi S. The impact of diagnostic changes on the rise in thyroid cancer incidence: a population-based study in selected high-resource countries. *Thyroid*. 2015 Oct;25(10):1127-36.
7. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*. 2013;2013:965212.
8. 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 Aug;49(4):503-9.

-
9. Kowalski LP, Gonçalves Filho J, Pinto CA, Carvalho AL, de Camargo B. Long-term survival rates in young patients with thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Jul;129(7):746-9.
 10. 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 Dec;164(6):658-61.
 11. Dottorini ME, Vignati A, Mazzucchelli L, Lomuscio G, Colombo L. Differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents: a 37-year experience in 85 patients. *J Nucl Med*. 1997 May;38(5):669-75.
 12. Liu FH, Kuo SF, Hsueh C, Chao TC, Lin JD. Postoperative recurrence of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis. *J Surg Oncol*. 2015 Aug;112(2):149-54.
 13. Schlumberger M. [Papillary and follicular thyroid carcinoma]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2007 Jun;68(2-3):120-8.
 14. Zhu J, Wang X, Zhang X, Li P, Hou H. Clinicopathological features of recurrent papillary thyroid cancer. *Diagn Pathol*. 2015 Jul 14;10:96.
 15. Schlumberger M, Métivier H, Pacini F. [Chernobyl 13 years after: consequences for protection of populations]. *Rev Prat*. 1999 Sep 15;49(14):1489-91.
 16. Ruggeri RM, Campennì A, Baldari S, Trimarchi F, Trovato M. What is new on thyroid cancer biomarkers. *Biomark Insights*. 2008 Apr 29;3:237-52.
 17. Carling T, Ocal IT, Udelsman R. Special variants of differentiated thyroid cancer: does it alter the extent of surgery versus well-differentiated thyroid cancer?. *World J Surg*. 2007 May;31(5):916-23.

-
18. 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 Dec;114(6):1050-7; discussion 1057-8.
 19. 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 Jul;130(7):819-24.
 20. Prescott JD, Sadow PM, Hodin RA, Le LP, Gaz RD, Randolph GW, Stephen AE, Parangi S, Daniels GH, Lubitz CC. BRAF V600E status adds incremental value to current risk classification systems in predicting papillary thyroid carcinoma recurrence. *Surgery*. 2012 Dec;152(6):984-90.
 21. Ywata de Carvalho A, Chulam TC, Kowalski LP. Long-term results of observation vs prophylactic selective level VI neck dissection for papillary thyroid carcinoma at a Cancer Center. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015 Jul;141(7):599-606.
 22. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 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 Jan;26(1):1-133.
 23. Watkinson JC. The British Thyroid Association guidelines for the management of thyroid cancer in adults. *Nucl Med Commun*. 2004 Sep;25(9):897-900.

-
24. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W; European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*. 2006 Jun;154(6):787-803.
 25. Nixon IJ, Whitcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, Patel SG, Ganly I. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*. 2012 Sep;22(9):884-9.
 26. Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med*. 1998 Jan 29;338(5):297-306.
 27. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer*. 2007 Jul 1;110(1):38-46.
 28. Wang LY, Migliacci JC, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, Patel SG, Ganly I. Management and outcome of clinically evident neck recurrence in patients with papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017 Nov;87(5):566-71.
 29. Gonçalves Filho J, Zafereo ME, Ahmad FI, Nixon IJ, Shaha AR, Vander Poorten V, Sanabria A, Hefetz AK, Robbins KT, Kamani D, Randolph GW, Coca-Pelaz A, Simo R, Rinaldo A, Angelos P, Ferlito A, Kowalski LP. Decision making for the central compartment in differentiated thyroid cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2018 Nov;44(11):1671-8.
 30. Ito Y, Higashiyama T, Takamura Y, Kobayashi K, Miya A, Miyauchi A. Clinical outcomes of patients with papillary thyroid carcinoma after the detection of distant recurrence. *World J Surg*. 2010 Oct;34(10):2333-7.

-
31. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann Surg Oncol*. 1996 Nov;3(6):534-8.
 32. Nixon IJ, Wang LY, Ganly I, Patel SG, Morris LG, Migliacci JC, Tuttle RM, Shah JP, Shaha AR. Outcomes for patients with papillary thyroid cancer who do not undergo prophylactic central neck dissection. *Br J Surg*. 2016 Feb;103(3):218-25.
 33. Sugitani I, Fujimoto Y, Yamada K, Yamamoto N. Prospective outcomes of selective lymph node dissection for papillary thyroid carcinoma based on preoperative ultrasonography. *World J Surg*. 2008 Nov;32(11):2494-502.
 34. Wu MH, Shen WT, Gosnell J, Duh QY. Prognostic significance of extranodal extension of regional lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *Head Neck*. 2015 Sep;37(9):1336-43.
 35. Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Ultrasonographically and anatomopathologically detectable node metastases in the lateral compartment as indicators of worse relapse-free survival in patients with papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2005 Jul;29(7):917-20.
 36. Cushing SL, Palme CE, Audet N, Eski S, Walfish PG, Freeman JL. Prognostic factors in well-differentiated thyroid carcinoma. *Laryngoscope*. 2004 Dec;114(12):2110-5.
 37. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Staging systems for papillary thyroid carcinoma: a review and comparison. *Ann Surg*. 2007 Mar;245(3):366-78.

-
38. Ito Y, Miyauchi A, Kobayashi K, Kihara M, Miya A. Static and dynamic prognostic factors of papillary thyroid carcinoma. *Endocr J*. 2014;61(12):1145-51.
 39. Momesso DP, Tuttle RM. Update on differentiated thyroid cancer staging. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2014 Jun;43(2):401-21.
 40. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2017.
 41. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferi EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009 Nov;19(11):1167-214.
 42. Elaraj DM, Clark OH. Changing management in patients with papillary thyroid cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2007 Aug;8(4):305-13.
 43. Podnos YD, Smith D, Wagman LD, Ellenhorn JD. The implication of lymph node metastasis on survival in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Am Surg*. 2005 Sep;71(9):731-4.
 44. Rovere RK, Awada A. Treatment of recurrent thyroid cancers--is there a light in the horizon?. *Curr Opin Oncol*. 2008 May;20(3):245-8.
 45. Tuttle RM, Tala H, Shah J, Leboeuf R, Ghossein R, Gonen M, Brokhin M, Omry G, Fagin JA, Shaha A. Estimating risk of recurrence in differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine remnant ablation: using response to therapy variables to modify the initial risk estimates predicted by the new American Thyroid Association staging system. *Thyroid*. 2010 Dec;20(12):1341-9.

-
46. Scheffell RS, Zanella AB, Antunes D, Dora JM, Maia AL. Low recurrence rates in a cohort of differentiated thyroid carcinoma patients: a referral center experience. *Thyroid*. 2015 Aug;25(8):883-9.
 47. Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, Cailou B, Travagli JP, Parmentier C. Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer*. 1985 Feb 15;55(4):794-804.
 48. Besic N, Auersperg M, Dremelj M, Vidergar-Kralj B, Gazic B. Neoadjuvant chemotherapy in 16 patients with locally advanced papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2013 Feb;23(2):178-84.
 49. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, Elisei R, Habra MA, Newbold K, Shah MH, Hoff AO, Gianoukakis AG, Kiyota N, Taylor MH, Kim SB, Krzyzanowska MK, Ductus CE, de las Heras B, Zhu J, Sherman SI. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2015 Feb 12;372(7):621-30.
 50. Barut F, Onak Kandemir N, Bektas S, Bahadir B, Keser S, Ozdamar SO. Universal markers of thyroid malignancies: galectin-3, HBME-1, and cytokeratin-19. *Endocr Pathol*. 2010 Jun;21(2):80-9.
 51. Lee YM, Lee JB. Prognostic value of epidermal growth factor receptor, p53 and galectin-3 expression in papillary thyroid carcinoma. *J Int Med Res*. 2013 Jun;41(3):825-34.
 52. Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H. Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. *Clin Cancer Res*. 2003 Jan;9(1):68-75.

-
53. Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, Pellegata NS, Gimm O, Jhiang S, Davuluri RV, de la Chapelle A, Eng C. Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol*. 2004 Sep 1;22(17):3531-9.
54. Stolf BS, Santos MM, Simao DF, Diaz JP, Cristo EB, Hirata R Jr, Curado MP, Neves EJ, Kowalski LP, Carvalho AF. Class distinction between follicular adenomas and follicular carcinomas of the thyroid gland on the basis of their signature expression. *Cancer*. 2006 May 1;106(9):1891-900.
55. Cerutti JM, Latini FR, Nakabashi C, Delcelo R, Andrade VP, Amadei MJ, Maciel RM, Hojaij FC, Hollis D, Shoemaker J, Riggins GJ. Diagnosis of suspicious thyroid nodules using four protein biomarkers. *Clin Cancer Res*. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3311-8.
56. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7.
57. Pires AR, Andreiuolo Fda M, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol*. 2006 Jul 25;1:14.
58. Tripodi SA, Rocca BJ, Hako L, Barbagli L, Bartolommei S, Ambrosio MR. Quality control by tissue microarray in immunohistochemistry. *J Clin Pathol*. 2012 Jul;65(7):635-7.
59. Liu YY, Morreau H, Kievit J, Romijn JA, Carrasco N, Smit JW. Combined immunostaining with galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, Hector Battifora mesothelial-1, cytokeratin-19, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , and sodium/iodide symporter antibodies for the differential

- diagnosis of non-medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2008 Mar;158(3):375-84.
60. Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl)*. 1998 May;76(6):402-12.
61. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):20807-10.
62. Türköz HK, Oksüz H, Yurdakul Z, Ozcan D. Galectin-3 expression in tumor progression and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol*. 2008 Summer;19(2):92-6.
63. Nakamura M, Inufusa H, Adachi T, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, Wakano T, Nakajima A, Hida JI, Miyake M, Shindo K, Yasutomi M. Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis. *Int J Oncol*. 1999 Jul;15(1):143-8.
64. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*. 2004;9(2):305-28.
65. Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. *Semin Cancer Biol*. 2014 Aug;27:30-8.
66. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6363-7.
67. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orlandi F, Nardi F, Vecchione A, Tecce R, Larsson O; Thyroid Cancer Study Group. Application of an immunodiagnostic

- method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet*. 2001 May 26;357(9269):1644-50.
68. Chiu CG, Strugnell SS, Griffith OL, Jones SJ, Gown AM, Walker B, Nabi IR, Wiseman SM. Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. *Am J Pathol*. 2010 May;176(5):2067-81.
69. Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, Sueyoshi K, Aikou T, Sato E. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol*. 2000 Apr;31(4):428-33.
70. Cvejic DS, Savin SB, Petrovic IM, Paunovic IR, Tatic SB, Havelka MJ. Galectin-3 expression in papillary thyroid carcinoma: relation to histomorphologic growth pattern, lymph node metastasis, extrathyroid invasion, and tumor size. *Head Neck*. 2005 Dec;27(12):1049-55.
71. de Matos LL, Del Giglio AB, Matsubayashi CO, de Lima Farah M, Del Giglio A, da Silva Pinhal MA. Expression of CK-19, galectin-3 and HBME-1 in the differentiation of thyroid lesions: systematic review and diagnostic meta-analysis. *Diagn Pathol*. 2012 Aug 13;7:97.
72. Isic Dencic T, Cvejic D, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Savin S. Cytokeratin19 expression discriminates papillary thyroid carcinoma from other thyroid lesions and predicts its aggressive behavior. *Med Oncol*. 2013 Mar;30(1):362.
73. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2001 Apr;14(4):338-42.

-
74. Song Q, Wang D, Lou Y, Li C, Fang C, He X, Li J. Diagnostic significance of CK19, TG, Ki67 and galectin-3 expression for papillary thyroid carcinoma in the northeastern region of China. *Diagn Pathol*. 2011 Dec 21;6:126.
75. Sahoo S, Hoda SA, Rosai J, DeLellis RA. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution. *Am J Clin Pathol*. 2001 Nov;116(5):696-702.
76. Feng J, Zhu R, Chang C, Yu L, Cao F, Zhu G, Chen F, Xia H, Lv F, Zhang S, Sun L. CK19 and glypican 3 expression profiling in the prognostic indication for patients with HCC after surgical resection. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151501.
77. Liu LZ, Yang LX, Zheng BH, Dong PP, Liu XY, Wang ZC, Zhou J, Fan J, Wang XY, Gao Q. CK7/CK19 index: A potential prognostic factor for postoperative intrahepatic cholangiocarcinoma patients. *J Surg Oncol*. 2018 Jun;117(7):1531-9.
78. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992 Dec;168(4):357-63.
79. Luporsi E, André F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, Tubiana-Mathieu N, Sigal-Zafrani B, Arnould L, Gompel A, Egele C, Poulet B, Clough KB, Crouet H, Fourquet A, Lefranc JP, Mathelin C, Rouyer N, Serin D, Spielmann M, Haugh M, Chenard MP, Brain E, de Cremoux P, Bellocq JP. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(3):895-915.

-
80. Shahait M, Nassif S, Tamim H, Mukherji D, Hijazi M, El Sabban M, Khaulil R, Bulbul M, Abou Kheir W, El Hajj A. Ki-67 expression predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy in the setting of positive surgical margins. *BMC Urol.* 2018 Mar 5;18(1):13.
81. Dwivedi SS, Khandeparkar SG, Joshi AR, Kulkarni MM, Bhayekar P, Jadhav A, Nayar M, Kambale NS. Study of immunohistochemical markers (CK-19, CD-56, Ki-67, p53) in differentiating benign and malignant solitary thyroid nodules with special reference to papillary thyroid carcinomas. *J Clin Diagn Res.* 2016 Dec;10(12):EC14-EC19.
82. Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M, Ito Y, Kihara M, Higashiyama T, Yabuta T, Masuoka H, Shindo H, Kobayashi K, Miya A. Ki-67 labeling index is a predictor of postoperative persistent disease and cancer growth and a prognostic indicator in papillary thyroid carcinoma. *Eur Thyroid J.* 2013 Mar;2(1):57-64.
83. Ito Y, Miyauchi A, Kakudo K, Hirokawa M, Kobayashi K, Miya A. Prognostic significance of ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg.* 2010 Dec;34(12):3015-21.
84. Zhou Y, Jiang HG, Lu N, Lu BH, Chen ZH. Expression of ki67 in papillary thyroid microcarcinoma and its clinical significance. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(4):1605-8.
85. Tang J, Gui C, Qiu S, Wang M. The clinicopathological significance of Ki67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator?. *World J Surg Oncol.* 2018 May 31;16(1):100.
86. Fisher KE, Jani JC, Fisher SB, Foulks C, Hill CE, Weber CJ, Cohen C, Sharma J. Epidermal growth factor receptor overexpression is a marker for adverse pathologic features in papillary thyroid carcinoma. *J Surg Res.* 2013 Nov;185(1):217-24.

-
87. Landriscina M, Pannone G, Piscazzi A, Toti P, Fabiano A, Tortorella S, Occhini R, Ambrosi A, Bufo P, Cignarelli M. Epidermal growth factor receptor 1 expression is upregulated in undifferentiated thyroid carcinomas in humans. *Thyroid*. 2011 Nov;21(11):1227-34.
88. Akslen LA, Myking AO, Salvesen H, Varhaug JE. Prognostic impact of EGF-receptor in papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer*. 1993 Oct;68(4):808-12.
89. Mallick UK. The revised American Thyroid Association management guidelines 2009 for patients with differentiated thyroid cancer: an evidence-based risk-adapted approach. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 Aug;22(6):472-4.
90. Sethi K, Sarkar S, Das S, Rajput S, Mazumder A, Roy B, Patra S, Mohanty B, El-Naggar AK, Mandal M. Expressions of CK-19, NF-kappaB, E-cadherin, beta-catenin and EGFR as diagnostic and prognostic markers by immunohistochemical analysis in thyroid carcinoma. *J Exp Ther Oncol*. 2011;9(3):187-99.
91. Cvejic D, Savin S, Petrovic I, Paunovic I, Tatic S, Krgovic K, Havelka M. Galectin-3 expression in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Histopathology*. 2005 Aug;47(2):209-14.
92. Londero SC, Godballe C, Kroghdahl A, Bastholt L, Specht L, Sørensen CH, Pedersen HB, Pedersen U, Christiansen P. Papillary microcarcinoma of the thyroid gland: is the immunohistochemical expression of cyclin D1 or galectin-3 in primary tumour an indicator of metastatic disease?. *Acta Oncol*. 2008;47(3):451-7.
93. Tang W, Huang C, Tang C, Xu J, Wang H. Galectin-3 may serve as a potential marker for diagnosis and prognosis in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:455-60.

-
94. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, et al., eds. New York: Springer; 2009.
 95. Barnes L, Eveson, JW, Reichart P, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
 96. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 1988;104:947-53.
 97. Holler T, Theriault J, Payne RJ, Clark J, Eski S, Freeman JL. Prognostic factors in patients with multiple recurrences of well-differentiated thyroid carcinoma. *J Oncol* 2009; 2009:650340.
 98. Lee SH, Roh JL, Gong G, Cho KJ, Choi SH, Nam SY, Kim SY. Risk factors for recurrence after treatment of N1b papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg*. 2018 Feb 16.
 99. Ito Y, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Risk factors for recurrence to the lymph node in papillary thyroid carcinoma patients without preoperatively detectable lateral node metastasis: Validity of prophylactic modified radical neck dissection. *World J Surg*. 2007;31:2085-91.
 100. Ito Y, Kudo T, Kobayashi K, Miya A, Ichihara K, Miyauchi A. Prognostic factors for recurrence of papillary thyroid carcinoma in the lymph nodes, lung and bone: analysis of 5,768 patients with average 10-year follow-up. *World J Surg*. 2012;36(6):1274-8.
 101. Toniato A, Boschini I, Casara D, Mazzarotto R, Rubello D, Pelizzo M. Papillary thyroid carcinoma: factors influencing recurrence and survival. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(5):1518-22.

-
102. Cramer JD, Fu P, Harth KC, Margevicius S, Wilhelm SM. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results National Cancer Data Registry. *Surgery*. 2010;148:1147-52.
 103. Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid*. 2011;21(2):125-34.
 104. Lira RB, Carvalho GB, Gonçalves Filho J, Kowalski LP. Evolution in the profile of thyroid cancer cases treated in an oncology reference service: what changed in the last 20 years. *Rev Col Bras Cir*. 2014;41(5):320-4.
 105. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Patterns of failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. *Head Neck*. 1998;20(1):26-30.
 106. Shah JP, Patel SG, Singh B. *Head and neck: surgery and oncology*. St. Louis: Elsevier, Mosby; 2012.
 107. Wang W, Wang H, Teng X, Wang H, Mao C, Teng R, Zhao W, Cao J, Fahey TJ 3rd, Teng L. Clonal analysis of bilateral, recurrent, and metastatic papillary thyroid carcinomas. *Hum Pathol*. 2010; 41:1299-309.
 108. Young S, Harari A, Smooke-Praw S, Ituarte PH, Yeh MW. Effect of reoperation on outcomes in papillary thyroid cancer. *Surgery*. 2013;154(6):1354-61.
 109. Patron V, Hitier M, Bedfert C, Le Clech G, Jégoux F. Occult lymph node metastases increase locoregional recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012 May; 121(5):283-90.
 110. Magarey MJ, Freeman JL. Recurrent well-differentiated thyroid carcinoma. *Oral Oncol*. 2013;49(7):689-94.

-
111. Fernandez IJ, Piccin O, Sciascia S, Cavicchi O, Repaci A, Vicennati V, Fiorentino M. Clinical significance of BRAF mutation in thyroid papillary cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;148(6):919-25.
 112. Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimasic T, Ghossein RA, Fagin JA. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(9):E1562-6.
 113. Laco J, Ryska A, Cap J, Celakovsky P. Expression of galectin-3, cytokeratin 19, neural cell adhesion molecule and E-cadherin in certain variants of papillary thyroid carcinoma. *Cesk Patol.* 2008;44(4):103-7.
 114. Salajegheh A, Dolan-Evans E, Sullivan E, Irani S, Rahman MA, Vosgha H, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. The expression profiles of the galectin gene family in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma with particular emphasis on galectin-1 and galectin-3 expression. *Exp Mol Pathol.* 2014; 96(2):212-8.
 115. Oestreicher-Kedem Y, Halpern M, Roizman P, Hardy B, Sulkes J, Feinmesser R, Stern Y. Diagnostic value of galectin-3 as a marker for malignancy in follicular patterned thyroid lesions. *Head Neck.* 2004;26(11):960-6.
 116. Newlaczyl AU, Yu LG. Galectin-3—a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett.* 2011;313(2):123-8.
 117. Kim ES, Lim DJ, Lee K, Jung CK, Bae JS, Jung SL, Baek KH, Lee JM, Moon SD, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY. Absence of galectin-3 immunostaining in fine-needle aspiration cytology specimens from papillary thyroid carcinoma is associated with favorable pathological indices. *Thyroid.* 2012;22(12):1244-50.

118. Aratake Y, Nomura H, Kotani T, Marutsuka K, Kobayashi K, Kuma K, Miyauchi A, Okayama A, Okayama A. Coexistent anaplastic and differentiated thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(3):399-406.
119. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, De Giuli P, Angeli A. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 1998;58(14):3015-20.
120. Pan DH, Wen Dy, Luo YH, Chen G, Yang H, Chen JQ, He Y. The diagnostic and prognostic values of Ki-67/MIB-1 expression in thyroid cancer: a meta-analysis with 6051 cases. *Onco Targets Ther.* 2017;10:3261-76.