

Paula Martinez Vianna

Neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero: avaliação morfológica, molecular e imuno-histoquímica com ênfase ao estudo da transição epitélio-mesênquima

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2023

Paula Martinez Vianna

Neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero: avaliação morfológica, molecular e imuno-histoquímica com ênfase ao estudo da transição epitélio-mesênquima

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

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Venancio Avancini
Ferreira Alves

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vianna, Paula Martinez
Neoplasias encapsuladas da tireoide com
características nucleares de carcinoma papilífero :
avaliação morfológica, molecular e imuno-histoquímica
com ênfase ao estudo da transição epitélio-
mesênquima / Paula Martinez Vianna. -- São Paulo,
2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientador: Venancio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Patologia cirúrgica
2.Tireoidectomia 3.Carcinoma papilífero de tireoide
4.Imuno-histoquímica 5.Mutação puntual 6.Proteínas
BRAF Proto-Oncogênicas 7.Gene NRAS

USP/EM/DBD-444/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico esta tese ao meu avô Alberto Raul Martinez que foi minha grande
inspiração para estudar medicina*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves agradeço por todos os ensinamentos, não apenas durante a orientação desta tese, mas também na rotina diária de patologia cirúrgica. Muito obrigada pela paciência comigo, pelas conversas, acolhimento e por me estimular a ser uma patologista melhor a cada dia.

A todos os envolvidos na parte técnica desta tese, em especial:

- Alda Wakamatsu e Aline Assato que realizaram a maior parte das reações imuno-histoquímicas,
- Cássia e Quitéria, técnicas do Laboratório CICAP, que cortaram os blocos estudados nesta tese
- Prof. Dra. Janete Cerutti que me recebeu de braços abertos no Laboratório As Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP
- Gabriel Gama que me ensinou de forma primorosa tudo sobre extração de DNA e sequenciamento genético, que me colocou literalmente para trabalhar na “bancada” quantos dias fossem precisos para que tudo saísse perfeito

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto e Priscila Negreiros pelo apoio na análise estatística.

Aos patologistas que participaram da minha formação durante a Residência Médica, em especial a Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira que também me ajudou neste trabalho.

Aos meus colegas e sócios do Laboratório CICAP pelo agradável convívio diário, troca de conhecimento e experiências. Obrigada pelo apoio durante esses anos.

À minha tia Dra. Maria Regina Vianna que é meu maior exemplo de patologista “da vida real”. Obrigada pelos ensinamentos diários, broncas, conversas e risadas. Sem dúvidas a correria do dia a dia fica melhor com você por perto.

Aos meus pais, Consuelo e Leonel, pelo amor incondicional, apoio nas minhas decisões e por me mostrarem todo dia como é simples ser feliz. Com vocês do meu lado tudo fica mais fácil.

À minha irmã, Renata, pelo companheirismo, paciência e compreensão durante todos esses anos. Obrigada por cuidar tão bem de mim.

Aos meus tios, primos, sobrinhos e amigos cuja companhia alegra minha vida. Agradeço por ter vocês sempre comigo.

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 e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Critérios diagnósticos de carcinoma papilífero da tireoide.....	2
1.2	Subtipos histológicos do carcinoma papilífero da tireoide.....	3
1.3	Fatores prognósticos do carcinoma papilífero da tireoide.....	5
1.4	Estadiamento.....	7
1.5	Aspectos epidemiológicos do carcinoma papilífero da tireoide.....	9
1.6	Fatores de risco ambientais associados ao carcinoma papilífero de tireoide.....	10
1.7	Fatores genéticos associados ao carcinoma papilífero de tireoide.....	11
1.7.1	<i>BRAF</i>	11
1.7.2	<i>RAS</i>	13
1.7.3	<i>RET/PTC</i>	14
1.8	Transição epitélio-mesênquima.....	15
1.8.1	Transição epitélio-mesênquima no carcinoma papilífero de tireoide...	16
1.8.1.1	E-caderina.....	17
1.8.1.2	β -catenina.....	18
1.8.1.3	Vimentina.....	19
1.8.1.4	<i>Zinc Finger E-box Binding Homeobox (ZEB) 1 e 2</i>	20
1.9	Justificativa e resultados esperados.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivos gerais.....	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Ética em pesquisa.....	26
3.2	Casuística.....	26
3.2.1	Critérios de inclusão.....	26
3.2.2	Critérios de exclusão.....	27
3.2.3	Seleção dos casos.....	27
3.2.4	Obtenção de dados clínicos.....	28
3.2.5	Análise das características anatomopatológicas.....	28
3.3	Reações imuno-histoquímicas.....	30

3.3.1	Detalhamento do procedimento imuno-histoquímico.....	32
3.3.1.1	Procedimentos realizados no LIM-14.....	32
3.3.1.2	Procedimentos realizados na Divisão de Anatomia Patológica, Hospital das Clínicas – FMUSP.....	33
3.3.2	Avaliação dos estudos imuno-histoquímicos.....	34
3.3.2.1	Proteínas relacionadas à TEM.....	34
3.3.2.2	<i>BRAF</i> ^{V600E}	35
3.3.2.3	<i>NRAS</i> ^{Q61R}	35
3.4	Testes moleculares.....	36
3.4.1	Extração de DNA.....	37
3.4.1.1	Obtenção do tecido parafinado.....	37
3.4.1.2	Extração de DNA.....	38
3.4.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
3.4.3	Sequenciamento de DNA extraído das amostras (Método de Sanger).....	44
3.5	Análise estatística.....	45
4	RESULTADOS.....	46
4.1	Variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	47
4.2	Associação entre padrão arquitetural da neoplasia e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	54
4.3	Associação entre infiltração da cápsula tumoral e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	56
4.3.1	Associação entre o tipo de infiltração da cápsula tumoral e as demais variáveis anatomopatológicas.....	59
4.3.2	Avaliação da relação entre a ocorrência de infiltração capsular e cada variável anatomopatológica.....	60
4.4	Associação entre o tamanho da neoplasia e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	61
4.5	Transição epitélio-mesênquima: padrão de expressão e distribuição semiquantitativa dos marcadores imuno-histoquímicos relacionados à TEM nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	63
4.5.1	E-caderina.....	63
4.5.1.1	Padrão de expressão e distribuição semiquantitativa da E-caderina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	63
4.5.2	β -catenina.....	66
4.5.2.1	Padrão de expressão da β -catenina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	66
4.5.2.2	Distribuição semiquantitativa da β -catenina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	68
4.5.3	Vimentina.....	69
4.5.3.1	Padrão de expressão da Vimentina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	69

4.5.3.2	Distribuição semiquantitativa da Vimentina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	71
4.5.4	ZEB-1.....	72
4.5.4.1	Padrão de expressão e distribuição semiquantitativa de ZEB-1 nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	72
4.5.5	ZEB-2.....	74
4.5.5.1	Padrão de expressão e distribuição semiquantitativa de ZEB-2 nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias.....	74
4.6	Comparação da distribuição semiquantitativa da expressão imunohistoquímica dos marcadores relacionados à TEM nas células neoplásicas nas diferentes regiões tumorais amostradas.....	76
4.7	Comparação da distribuição semiquantitativa da expressão imunohistoquímica dos marcadores relacionados à TEM nas células neoplásicas nas diferentes regiões tumorais amostradas de acordo com padrão arquitetural da neoplasia.....	77
4.7.1	Neoplasias sem infiltração da cápsula de acordo com padrão arquitetural.....	77
4.7.2	Neoplasias com infiltração da cápsula de acordo com padrão arquitetural.....	78
4.8	Associação entre a ocorrência de TEM nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula de acordo com cada marcador imunohistoquímico e as variáveis anatomopatológicas.....	80
4.8.1	E-caderina.....	80
4.8.2	β -catenina.....	81
4.8.2.1	Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pelo ganho de expressão anômala em citoplasma da β -catenina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas.....	82
4.8.2.2	Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pela semiquantificação da expressão em membrana da β -catenina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas.....	83
4.8.2.3	Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático e pela semiquantificação da expressão em membrana da β -catenina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas.....	85
4.8.3	Vimentina.....	86
4.8.3.1	Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pelo padrão de expressão citoplasmático difuso da Vimentina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas.....	87
4.8.3.2	Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pela semiquantificação da expressão citoplasmática basal (subnuclear) da Vimentina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas.....	88

4.9	Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pela semiquantificação da expressão de todos os marcadores imuno-histoquímico em conjunto nas células neoplásicas.....	89
4.10	Exame imuno-histoquímico para expressão da proteína mutada <i>BRAF</i> ^{V600E}	91
4.10.1	Caracterização morfológica dos casos positivos para expressão da proteína mutada <i>BRAF</i> ^{V600E}	92
4.10.2	Associação entre expressão da proteína mutada <i>BRAF</i> ^{V600E} e as variáveis anatomopatológicas.....	93
4.10.3	Associação entre expressão da proteína mutada <i>BRAF</i> ^{V600E} e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula.....	96
4.11	Exame imuno-histoquímico para expressão da proteína mutada <i>NRAS</i> ^{Q61R}	97
4.12	Sequenciamento para o gene <i>BRAF</i>	98
4.12.1	Caracterização morfológica dos casos positivos para mutação do gene <i>BRAF</i> ^{T1799A} (p. V600E).....	98
4.12.2	Associação entre mutação do gene <i>BRAF</i> ^{T1799A} (p. V600E) e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	100
4.12.3	Associação entre mutação do gene <i>BRAF</i> ^{T1799A} (p. V600E) e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula.....	104
4.12.4	Comparação do sequenciamento para detecção de mutação do gene <i>BRAF</i> e a detecção imuno-histoquímica da proteína mutada <i>BRAF</i> ^{V600E}	106
4.13	Sequenciamento para o gene <i>NRAS</i>	106
4.13.1	Caracterização morfológica dos casos positivos para mutação <i>NRAS</i> ^{A182G} (p. Q61R).....	107
4.13.2	Associação entre mutação <i>NRAS</i> ^{A182G} (p. Q61R) e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	108
4.13.3	Associação entre mutação <i>NRAS</i> ^{A182G} (p. Q61R) e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula.....	110
4.13.4	Comparação entre o sequenciamento para detecção de mutação do gene <i>NRAS</i> e a detecção imuno-histoquímica da proteína mutada <i>NRAS</i> ^{Q61R}	111
5	DISCUSSÃO	113
5.1	Características histológicas.....	114
5.2	Transição epitélio-mesênquima.....	119
5.3	Características moleculares.....	124
6	CONCLUSÕES	132
7	REFERÊNCIAS	136

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AGES	<i>Age, Grade, Extent and Size</i>
AJCC	<i>American Joint Commission on Cancer</i>
AMES	<i>Age, Distant Metastasis, Extension and Size</i>
APC	Complexo adenomatose polipose coli
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
<i>BRAF</i>	Proto-oncogene <i>B-raf</i>
CDH1	Gene CDH1 (do inglês <i>Cadherin 1</i>)
CICAP	Centro de Imuno-histoquímica, Citopatologia e Anatomia Patológica
DAP	Divisão de Anatomia Patológica
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GLOBOCAN	Base de dados com informações estatísticas de incidência e mortalidade (do inglês <i>Global Cancer Observatory</i>)
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase 3 β
HAOC	Hospital Alemão Oswaldo Cruz
HC	Hospital das Clínicas
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
<i>HRAS</i>	Gene <i>Harvey Rat sarcoma</i>
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde
<i>KRAS</i>	Gene <i>Kirsten Rat sarcoma</i>
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14
MACIS	<i>Distant Metastases, Age, Completeness of Resection, Invasion, Size</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NIFTP	Neoplasia folicular não invasiva da tireoide com características nucleares papilíferas símile
<i>NRAS</i>	Gene “neuroblastoma <i>RAS</i> ”
NTC	Controle negativo da eletroforese
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>PAX8-PPARY</i>	Rearranjo entre os genes <i>PAX8</i> e <i>PPARY</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PF</i>	<i>Primer Forward</i>
PI3K	Proteína quinase fosfoinositídeo-3
<i>PR</i>	<i>Primer Reverse</i>
<i>RAS</i>	Gene <i>RAS</i> (do inglês <i>Rat sarcoma</i>)
<i>RET</i>	Proto-oncogene <i>RET</i>
<i>RET/PTC</i>	Rearranjo cromossômico do proto-oncogene <i>RET</i> na tireoide
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TERT	Gene <i>TERT</i> (do inglês <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>)

TMN	Sistema de classificação de tumores malignos
TP53	Gene TP53 (do inglês <i>Tumor protein p53</i>)
TSH	Hormônio tireoestimulante
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
WNT	Via de sinalização Wnt (do inglês <i>Wingless-related integration site</i>)
ZEB-1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB-2	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>

Lista de figuras

Figura 1 -	Critérios de avaliação nuclear em escore de 0 a 3.....	3
Figura 2 -	Complexo E-caderina – catenina.....	17
Figura 3 -	Fluxograma dos casos incluídos no estudo.....	28
Figura 4 -	Invasão da cápsula. A, B e I - Invasão intracapsular. C, D, E e H - Invasão transcapsular. F - células neoplásicas isoladas alinhados perpendicularmente à cápsula, não considerada infiltração da cápsula. G - células neoplásicas isoladas alinhadas de forma paralela à cápsula, não considerada infiltração. J - Células neoplásicas na cápsula envoltas por processo inflamatório, não considerada infiltração.....	29
Figura 5 -	Detalhamento da quantificação da expressão dos anticorpos relacionados a TEM. Realizada a estimativa em um campo de grande aumento, em intervalos de 10%, da melhor área de marcação (<i>hot spot</i>) no centro do tumor (Área 1), na periferia junto à cápsula (Área 2) e no fronte de invasão da cápsula (Área 3), quando houver.....	34
Figura 6 -	Fluxograma dos casos sequenciados.....	36
Figura 7 -	Macrodissecção - Identificação da área de interesse no corte do bloco de parafina com caneta marcadora.....	38
Figura 8 -	Macrodissecção - Extração do tecido por meio de raspagem com lâmina bisturi estéril.....	38
Figura 9 -	Exemplo de curvas na espectrofotometria mostrando boa qualidade da extração de DNA.....	40
Figura 10 -	Eletroforese em gel de agarose para avaliação da amplificação do gene <i>BRAF</i> (<i>tamanho do produto - 195 pb</i>).....	43
Figura 11 -	Eletroforese em gel de agarose para avaliação da amplificação do gene <i>NRAS</i> (<i>tamanho do produto - 123 pb</i>).....	43
Figura 12 -	Cápsula tumoral. A - Cápsula tumoral delgada (espessura $\leq 0,5$ mm). B - Cápsula tumoral espessa (espessura $> 0,5$ mm). C - Infiltração neoplásica intracapsular. D e E - Infiltração neoplásica transcapsular. F - Foco de invasão vascular junto da cápsula. Aumento de 100x em A, B, D, E e F. Aumento de 200x em C.....	51
Figura 13 -	Neoplasias menores ou iguais a 10,0 mm. A - Padrão arquitetural puramente papilar, com cápsula tumoral delgada e sem infiltração. B - Padrão arquitetural puramente folicular, com cápsula tumoral espessa e sem infiltração. C e D - Medida da espessura da cápsula. Foto panorâmica em A e B. Aumento de 100x em C. Aumento de 200x em D.....	52
Figura 14 -	Fluxograma dos 103 casos estudados levando em consideração as seguintes variáveis histológicas - padrão arquitetural, infiltração da cápsula, invasão vascular e metástase linfonodal.....	53
Figura 15 -	Padrão de expressão da E-caderina. A e B - marcação no centro do tumor. C e D - marcação na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x.....	65
Figura 16 -	Expressão da E-caderina no fronte de invasão da cápsula. A, B, C e D - Exemplos de diminuição da expressão no fronte. Aumento de 400x.....	65
Figura 17 -	Marcação da β -catenina em membrana. A e B - Marcação no centro (aumento de 400x). C e D - Marcação na periferia junto à cápsula tumoral. Aumento de 400X em A e B. Aumento de 200x em C e D.....	67

Figura 18 -	Marcação de β -catenina no fronte de invasão da cápsula. A e B - Marcação em membrana com diminuição da expressão no fronte. C e D - Marcação em membrana diminuída, com ganho de expressão em citoplasma. Aumento de 400x.....	67
Figura 19 -	Expressão de Vimentina padrão citoplasmático basal subnuclear. A e B - no centro do tumor. C e D - na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x..	70
Figura 20 -	Marcação de Vimentina no fronte de invasão da cápsula. A - Diminuição da marcação citoplasmática basal subnuclear no fronte. B, C e D - Marcação citoplasmática difusa no fronte. Aumento de 400x.....	70
Figura 21 -	Expressão do ZEB-1 nas células estromais tumorais. A e B - No centro do tumor. C e D - Na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x.....	73
Figura 22 -	Expressão de ZEB-1 nas células estromais tumorais no fronte de invasão da cápsula. Aumento de 100x em A. Aumento de 200x em B, C e D.....	73
Figura 23 -	Expressão do ZEB-2 nas células estromais tumorais. A e B - no centro do tumor. C e D - na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x em A, B e C. Aumento de 100x em D.....	75
Figura 24 -	Expressão de ZEB-2 nas células estromais tumorais no fronte de invasão da cápsula. Aumento de 100x em A. Aumento de 200x em B, C e D.....	75
Figura 25 -	Reações imuno-histoquímicas para <i>BRAF^{V600E}</i> positivas (VE1). A- Intensidade forte (Aumento de 40x), B- Intensidade moderada (Aumento de 40x), ambos com controle interno negativo. C- Intensidade forte (Aumento de 400x), D- Intensidade moderada. Aumento de 40x em A e B. Aumento de 400x em C e D.....	91
Figura 26 -	Eletroesferograma mostrando substituição da timina pela adenina (T1799A) no éxon 15 do gene <i>BRAF</i>	98
Figura 27 -	Eletroesferograma mostrando substituição da Adenina pela Guanina (A182G) no éxon 3 do gene <i>NRAS</i>	107

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Detalhamento das reações imuno-histoquímicas.....	31
Tabela 2 -	Resumo da padronização das reações imuno-histoquímicas.....	32
Tabela 3 -	Iniciadores (primers) utilizados para amplificação dos genes <i>NRAS</i> e <i>BRAF</i>	41
Tabela 4 -	Solução para PCR gene <i>BRAF</i>	41
Tabela 5 -	Solução para PCR gene <i>NRAS</i>	42
Tabela 6 -	Protocolo para realização de amplificação do gene <i>BRAF</i> , com detalhamento da temperatura, tempo (minutos ou segundos) e número de ciclos realizados.....	42
Tabela 7 -	Protocolo para realização de amplificação do gene <i>NRAS</i> , com detalhamento da temperatura, tempo (minutos ou segundos) e número de ciclos realizados.....	42
Tabela 8 -	Solução para sequenciamento.....	45
Tabela 9 -	Detalhamento da distribuição das variáveis clínico-patológicas.....	49
Tabela 10 -	Associação entre variáveis clínico-patológicas e o padrão arquitetural da neoplasia.....	54
Tabela 11 -	Associação entre variáveis clínico-patológicas e infiltração da cápsula tumoral.....	57
Tabela 12 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e o tipo de infiltração da cápsula tumoral.....	60
Tabela 13 -	Avaliação da relação entre cada variável anatomopatológica e a ocorrência de infiltração capsular	61
Tabela 14 -	Associação entre variáveis clínico-patológicas e tamanho do nódulo neoplásico.....	61
Tabela 15 -	Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de E-caderina em intervalos de 10% no fronte de invasão, na periferia do tumor junto à cápsula e no centro da neoplasia.....	64
Tabela 16 -	Padrão de expressão imuno-histoquímica de β -catenina (padrão de marcação em membrana e citoplasmática) no fronte de invasão da cápsula (69 casos), no centro tumoral e na periferia de todas as neoplasias (103 casos).....	66
Tabela 17 -	Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica em membrana da β -catenina em intervalos de 10% no fronte de invasão, na periferia do tumor junto à cápsula e no centro da neoplasia.....	68
Tabela 18 -	Padrão de expressão imuno-histoquímica de Vimentina (padrão de marcação citoplasmático basal – subnuclear e citoplasmático difuso) no fronte de invasão da cápsula (69 casos), no centro tumoral e na periferia de todas as neoplasias (103 casos).....	69
Tabela 19 -	Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica em padrão citoplasmático basal subnuclear da Vimentina em intervalos de 10% no fronte de invasão tumoral, no centro da neoplasia e na periferia do tumor.....	71
Tabela 20 -	Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de ZEB1 nas células estromais tumorais em intervalos de 10% no fronte de invasão, centro tumoral e na periferia.....	72

Tabela 21 -	Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de ZEB2 nas células estromais tumorais em intervalos de 10% no fronte de invasão, centro tumoral e na periferia.....	74
Tabela 22 -	Comparação da porcentagem expressão imuno-histoquímica dos anticorpos relacionados a TEM em diferentes regiões tumorais para todos os 103 nódulos estudados (com e sem invasão da cápsula). Testes de Wilcoxon para amostras pareadas.....	77
Tabela 23 -	Comparação da porcentagem de expressão imuno-histoquímica em diferentes regiões tumorais. Casos sem infiltração da cápsula (NIFTP - 15 casos; padrão puramente papilar - 4 casos; padrão misto - 15 casos). Testes de Wilcoxon para amostras pareadas.....	78
Tabela 24 -	Comparação da expressão imuno-histoquímica em diferentes regiões tumorais, de acordo com o padrão arquitetural nas neoplasias com invasão da cápsula. Testes de Wilcoxon para amostras pareadas.....	79
Tabela 25 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para marcação E-caderina no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral).....	81
Tabela 26 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para β -catenina caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral).....	82
Tabela 27 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para β -catenina caracterizada pela porcentagem de expressão nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula).....	84
Tabela 28 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para β -catenina caracterizada pela porcentagem de expressão e pelo padrão de expressão citoplasmático em conjunto nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral).....	85
Tabela 29 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para Vimentina caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático difuso nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)..	87
Tabela 30 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para Vimentina caracterizada pela porcentagem de expressão no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral).....	89
Tabela 31 -	Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima considerando todos os marcadores juntos (69 casos com invasão da cápsula tumoral).....	90
Tabela 32 -	Detalhamento das variáveis anatomopatológicas nos casos positivos para exame imuno-histoquímico para expressão da proteína mutada $BRAF^{V600E}$	93
Tabela 33 -	Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do exame imuno-histoquímico para $BRAF^{V600E}$	94
Tabela 34 -	Associação entre o resultado do exame imuno-histoquímico para $BRAF^{V600E}$ e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral).....	97
Tabela 35 -	Detalhamento das variáveis patológicas nos casos positivos para mutação do gene $BRAF^{T1799A}$ (p. V600E).....	99

Tabela 36 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do sequenciamento do gene <i>BRAF</i> ^{T1799A} (p. V600E).....	101
Tabela 37 - Associação entre mutação do gene <i>BRAF</i> ^{T1799A} e a ocorrência de TEM no frente de invasão da cápsula nos 53 casos sequenciados.....	105
Tabela 38 - Comparação entre os resultados do exame imuno-histoquímico e sequenciamento para gene <i>BRAF</i>	106
Tabela 39 - Detalhamento das variáveis patológicas nos casos positivos para mutação do gene <i>NRAS</i>	108
Tabela 40 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do sequenciamento do gene <i>NRAS</i>	109
Tabela 41 - Associação entre mutação do gene <i>NRAS</i> ^{A182G} e a ocorrência de TEM no frente de invasão da cápsula.....	111
Tabela 42 - Comparação entre os resultados do exame imuno-histoquímico e sequenciamento para <i>NRAS</i>	112

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Infiltração da cápsula por padrão arquitetural.....	55
Gráfico 2 -	Espessura da cápsula por padrão arquitetural.....	56
Gráfico 3 -	Fibrose intratumoral por padrão arquitetural.....	56
Gráfico 4 -	Invasão vascular por infiltração da cápsula tumoral.....	58
Gráfico 5 -	Metástase linfonodal por infiltração da cápsula tumoral.....	58
Gráfico 6 -	Fibrose intratumoral por infiltração da cápsula tumoral.....	59
Gráfico 7 -	Espessura da cápsula por infiltração da cápsula tumoral.....	59
Gráfico 8 -	Invasão vascular por tamanho do nódulo.....	62
Gráfico 9 -	Metástase linfonodal por tamanho do nódulo.....	63
Gráfico 10 -	Espessura da cápsula por tamanho do nódulo.....	63
Gráfico 11 -	Porcentagem de papilas por resultado da reação imuno-histoquímica para mutação do gene <i>BRAF</i> ^{V600E}	95
Gráfico 12 -	Fibrose intratumoral por resultado da reação imuno-histoquímica para mutação do gene <i>BRAF</i> ^{V600E}	96
Gráfico 13 -	Fibrose intratumoral por resultado do sequenciamento do gene <i>BRAF</i>	102
Gráfico 14 -	Metástase linfonodal por resultado do sequenciamento do gene <i>BRAF</i>	102
Gráfico 15 -	Resultado do sequenciamento do gene <i>BRAF</i> por tamanho do nódulo.....	103
Gráfico 16 -	Resultado do sequenciamento do gene <i>BRAF</i> por padrão arquitetural da neoplasia.....	103
Gráfico 17 -	Infiltração da cápsula tumoral por resultado do sequenciamento do gene <i>BRAF</i>	104

RESUMO

Vianna PM. Neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero: avaliação morfológica, molecular e imuno-histoquímica com ênfase ao estudo da transição epitélio-mesênquima [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: O carcinoma papilífero é a neoplasia maligna mais comum da tireoide. Seu diagnóstico baseia-se essencialmente na identificação de características nucleares bem estabelecidas. Desde a definição da “neoplasia folicular não invasiva da tireoide com características nucleares papilíferas símile (NIFTP)”, a avaliação da cápsula tumoral e do padrão arquitetural nas neoplasias encapsuladas com características nucleares de carcinoma papilífero têm ganhado maior importância na prática do patologista. **OBJETIVOS:** O presente estudo visa estender o conceito de lesões encapsuladas não invasivas da tireoide a neoplasias com formação de papilas em extensão variável, caracterizando estes tumores quanto a distribuição de variáveis clínicas e anatomopatológicas, tendo em vista principalmente determinar quais variáveis estão associadas às características histológicas com significado prognóstico (invasão vascular e metástase linfonodal), à expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais ligados à transição epitélio-mesênquima (TEM) e à presença de mutação dos genes *BRAF* e *NRAS*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Avaliamos retrospectivamente as variáveis clínicas e anatomopatológicas de 103 neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero. Realizamos o estudo através de exame imuno-histoquímico de marcadores relacionados à TEM (E-caderina, β -catenina, Vimentina, ZEB-1 e ZEB-2) em três regiões distintas no mesmo nódulo: centro do tumor, compartimento periférico não invasivo junto da cápsula tumoral e frente de invasão da cápsula quando presente. Adicionalmente pesquisamos a presença das mutações nos genes *BRAF* e *NRAS* pelo método imuno-histoquímico e pelo Sequenciamento de Sanger. **RESULTADOS:** A infiltração capsular foi a característica histológica associada à invasão vascular ($p=0,050$) e metástase linfonodal ($p=0,024$), sendo mais frequente em tumores com arquitetura papilar ($p=0,011$) e cápsula espessa ($p=0,007$). As células do frente de invasão da

cápsula tumoral apresentaram menor expressão imuno-histoquímica normal em membrana de E-caderina ($p=0,006^{-6}$) e β -catenina ($p=0,001^{-6}$) e citoplasmática basal (subnuclear) da Vimentina ($p=0,005^{-1}$), enquanto mostraram ganho da expressão citoplasmática difusa (“padrão mesenquimal”) da Vimentina e ganho do padrão anômalo citoplasmático de expressão de β -catenina, caracterizando a ocorrência de TEM apenas neste compartimento. A Vimentina quando estudada isoladamente mostrou que o fenômeno da TEM ocorreu principalmente nos casos com cápsula mais espessa ($p=0,040$) e naqueles com padrão arquitetural puramente papilar ($p=0,036$). ZEB-1 e ZEB-2 não foram expressos nas células epiteliais. A mutação no gene *BRAF* foi identificada principalmente nos tumores com maior porcentagem de formação de papilas ($p=0,008^{-3}$), naqueles com infiltração da cápsula tumoral ($p=0,004$) e na maior parte das neoplasias menores ou iguais a 10 mm ($p=0,006^{-1}$). Nenhum caso classificado histologicamente como NIFTP apresentou mutação no gene *BRAF*, sendo que dois deles apresentaram mutação no gene *NRAS*. Tumores sem mutação no gene *BRAF* mostraram menor frequência de metástase linfonodal ($p=0,027$).

CONCLUSÕES: A infiltração da cápsula tumoral mostrou-se um pré-requisito para invasão vascular e para metástase linfonodal, e o padrão arquitetural papilar da neoplasia destacou-se como a principal característica anatomopatológica associada à sua ocorrência. A capacidade de as células neoplásicas de invadir a cápsula tumoral mostrou-se morfológicamente relacionada com a expressão local de marcadores de TEM. O padrão de reatividade da Vimentina foi aquele que melhor caracterizou a ocorrência de TEM no fronte de invasão. O encontro da mutação no gene *BRAF* na maioria dos tumores subcentimétricos pode ser um indicador que esta seja desencadeadora de fenômenos iniciais no processo de carcinogênese, conferindo potencial mais agressivo a longo prazo. Neoplasias encapsuladas com formação de papilas sem mutação do *BRAF*, sem invasão vascular e sem infiltração da cápsula tumoral podem representar um subtipo de prognóstico favorável.

Palavras-chave: Patologia cirúrgica. Tireoidectomia. Carcinoma papilífero de tireoide. Imuno-histoquímica. Mutação puntual. Proteínas *BRAF* Proto-Oncogênicas. Gene *NRAS*.

ABSTRACT

Vianna PM. Encapsulated thyroid neoplasms with nuclear features of papillary carcinoma: morphological, molecular and immunohistochemical assessment with emphasis on the study of epithelial-mesenchymal transition [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

INTRODUCTION: Papillary carcinoma is the most common malignant neoplasm of the thyroid. Its diagnosis is essentially based on the identification of well-established nuclear characteristics. Since the definition of “noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features” (NIFTP), the evaluation of the tumor capsule and the architectural pattern in encapsulated neoplasms with nuclear features of papillary carcinoma have gained greater importance in the pathologist's practice. **OBJECTIVES:** The present study aims to expand the concept of non-invasive encapsulated thyroid lesions to neoplasms with variable extent of papillae formation, characterizing these tumors in terms of the distribution of clinical and anatomopathological variables, focusing mainly on determining which variables are associated with histological characteristics with prognostic significance (vascular invasion and lymph node metastasis), the expression of epithelial and mesenchymal markers linked to epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the presence of mutations in the *BRAF* and *NRAS* genes. **MATERIALS AND METHODS:** We retrospectively evaluated the clinical and anatomopathological variables of 103 encapsulated thyroid neoplasms with nuclear features of papillary carcinoma. We carried out the study through immunohistochemical examination of markers related to EMT (E-cadherin, β -catenin, Vimentin, ZEB-1 and ZEB-2) in three distinct regions in the same nodule: center of the tumor, non-invasive peripheral compartment and invasive front. Additionally, we investigated the presence of mutations in the *BRAF* and *NRAS* genes using the immunohistochemical method and Sanger Sequencing. **RESULTS:** Tumor capsule infiltration was the histological feature associated with vascular invasion ($p=0.050$) and lymph node metastasis ($p=0.024$), being more frequent in tumors with papillary architecture and thick capsule. Cells at the invasion front of the tumor capsule showed lower normal immunohistochemical membrane expression of E-cadherin ($p=0.006^6$) and β -

catenin ($p=0.001^{-6}$) and lower basal cytoplasmic (subnuclear) of Vimentin ($p=0.005^{-1}$), while they showed gain in diffuse cytoplasmic expression (“mesenchymal pattern”) of Vimentin and gain of the cytoplasmic anomalous pattern of β -catenin, characterizing the occurrence of EMT only in this compartment. Vimentin, when studied alone, showed that the phenomenon of EMT occurred mainly in cases with thicker capsule ($p=0.040$) and in those with purely papillary architectural pattern ($p=0.036$). ZEB-1 and ZEB-2 were not expressed in epithelial cells. The mutation in the *BRAF* gene was identified mainly in tumors with a higher percentage of papillae formation ($p=0.008^{-3}$), in those with infiltration of the tumor capsule ($p=0.004$) and in most neoplasms smaller than or equal to 10 mm ($p=0.006^{-1}$). None of the neoplasms classified histologically as NIFTP presented mutation in the *BRAF* gene, and two of them had mutation in the *NRAS* gene. Tumors without mutations in the *BRAF* gene showed a lower frequency of lymph node metastasis ($p=0.027$). **CONCLUSIONS:** Tumor capsule infiltration proved to be a prerequisite for vascular invasion and lymph node metastasis, and the papillary architectural pattern of the neoplasm presented as the main anatomopathological characteristic associated with its occurrence. The ability of neoplastic cells to invade the tumor capsule was shown to be morphologically related to the local expression of EMT markers. The Vimentin expression pattern was the one that best characterized the occurrence of EMT at the invasion front. The finding of *BRAF* gene mutation in most neoplasms smaller than or equal to 10 mm may be an indicator that it is a driver of initial phenomena in the carcinogenesis process, providing a more aggressive potential in the long term. Encapsulated neoplasms with papillae formation without *BRAF* mutation, with no evidence of vascular invasion and without tumor capsule infiltration may represent a subtype with a favorable prognosis.

Descriptors: Surgical pathology. Thyroidectomy. Papillary thyroid carcinoma. Immunohistochemistry. Point mutation. Proto-Oncogenic Proteins *BRAF*. *NRAS* gene.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Critérios diagnósticos de carcinoma papilífero da tireoide

Décadas atrás eram dois os principais critérios utilizados para o diagnóstico de carcinoma papilífero da tireoide:

1. formação de papila com eixo fibrovascular
2. características citológicas, dentre as quais a presença de núcleo em vidro fosco era a mais importante (1).

Posteriormente, na década de noventa até a quarta edição do livro da Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores da tireoide (2), as características nucleares das células neoplásicas, tais como aumento de tamanho, alongamento e sobreposição dos núcleos, contornos irregulares, fendas (*grooves*), pseudoinclusões, clareamento da cromatina e núcleos em vidro fosco, passaram a ser o único critério diagnóstico necessário.

O carcinoma papilífero da tireoide é atualmente definido pela OMS (3) como sendo neoplasia maligna epitelial com diferenciação folicular, com características nucleares distintas e que apresentem arquitetura papilar ou sólida/trabecular, ou exibam crescimento invasivo em tumores de padrão folicular. A motivação para a adição do padrão arquitetural na atual definição do carcinoma papilífero foi a recente caracterização da entidade denominada “neoplasia folicular não invasiva da tireoide com características nucleares papilíferas símile (NIFTP)”.

As características nucleares distintas observadas nos carcinomas papilíferos foram validadas por Nikiforov *et al.* (4) em 2016 através da formulação de um escore de 0 a 3 onde foi feita a análise do tamanho e formato dos núcleos; da irregularidade da membrana nuclear e das características da cromatina. Foram considerados como carcinoma papilífero casos com escore nuclear 2 e 3. Esse escore foi revalidado em 2018, mostrando-se reprodutível para ser utilizado por patologistas generalistas na identificação de características nucleares de carcinoma papilíferos em nódulos tiroidianos (5), principalmente para diagnóstico da subtipo folicular que tendem a apresentar alterações nucleares mais discretas (6, 7). Este mesmo escore foi utilizado na seleção dos casos do presente trabalho (Figura 1).

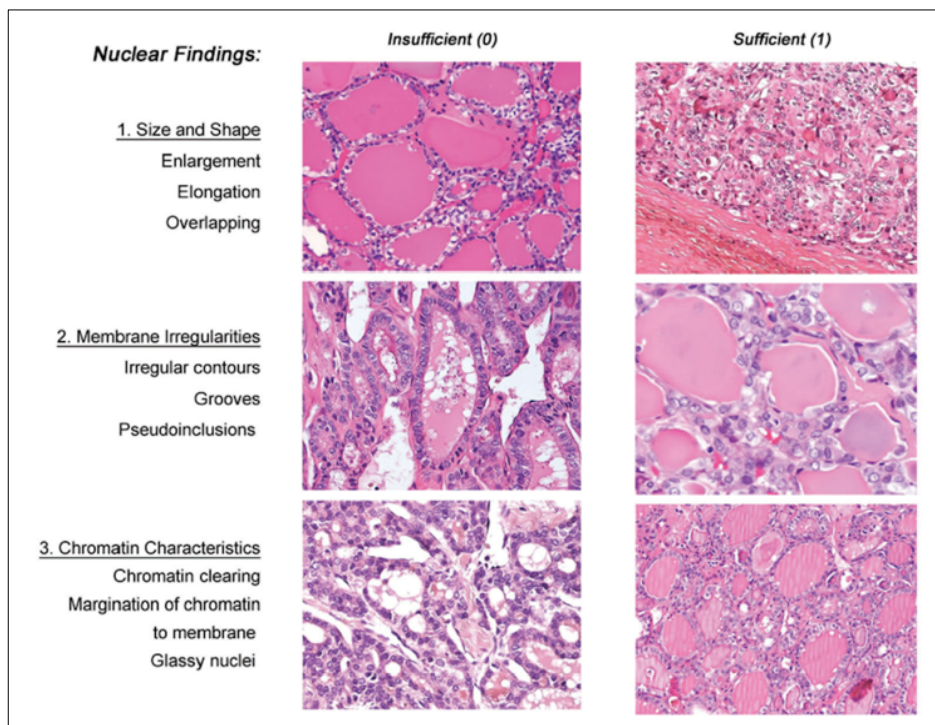


Figura 1 - Critérios de avaliação nuclear em escore de 0 a 3 (Retirado de Alves VA *et al.* *Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP): achieving better agreement by refining diagnostic criteria.* Clinics (Sao Paulo). 2018;73:e576 (7)

1.2 Subtipos histológicos do carcinoma papilífero da tireoide

A partir da década de noventa, quando a presença de papilas não foi mais necessária para o diagnóstico de carcinoma papilífero e sim exclusivamente as características nucleares, muitos subtipos do carcinoma papilífero foram descritos, dentre eles: clássico, folicular infiltrativo, encapsulado, oncocítico, de células claras, esclerosante difuso, de células altas, de células colunares, sólido/trabecular, Wharthin-símile e *hobnail*. Estes não são mutuamente exclusivos, pois um único tumor pode apresentar mais de um padrão histológico (8). A caracterização do subtipo é baseada na combinação do padrão arquitetural da neoplasia, características citológicas e presença de cápsula tumoral.

O subtipo clássico é o mais comum e compreende cerca de metade dos carcinomas papilíferos (9), definido por apresentar formação de papilas (mesmo que focal). Quando envolto por cápsula, este subtipo passa a ser designado clássico encapsulado.

O subtipo folicular foi descrito pela primeira vez na década de setenta (10) e para assim ser designado é necessária formação exclusiva ou

predominantemente de folículos. Compreende de 9 a 41% dos casos (11), sendo sua incidência difícil de determinar já que no passado algumas dessas lesões já foram classificadas como carcinomas foliculares ou adenomas (12). Mais recentemente, alguns autores consideram o subtipo folicular o mais prevalente (13, 14). Na última classificação da OMS (2022), este subtipo foi dividido em duas variantes distintas: encapsulada e infiltrativa, que apresentam características moleculares distintas (3).

Os subtipos encapsulados do carcinoma papilífero, seja clássico ou folicular, tem como característica comum apresentar uma cápsula fibrosa ao redor de toda a neoplasia que a separa do parênquima tireoidiano não neoplásico adjacente (1, 15). A espessura da cápsula pode variar de muito espessa até muito fina, nesta última situação podendo ser formada por uma única camada de tecido fibroso (16) e pode estar intacta ou apresentar áreas focais de infiltração (17).

O subtipo folicular encapsulado do carcinoma papilífero foi objeto de estudo para proposta de uma nova nomenclatura (4). Aquele estudo realizado com tumores maiores de 10,0 mm demonstrou que neoplasias com cápsula fibrosa ou com bordas bem demarcadas, padrão histológico folicular (menos de 1% de papilas), sem infiltração da cápsula ou vascular, ausência de corpos psamomatosos, ausência de necrose e até 3 mitoses por campo de grande aumento, têm prognóstico favorável, sem evidências de recidiva ou metástase naquela coleção de casos. Foi proposta então uma nova terminologia em que esses tumores deveriam ser chamados de “neoplasia folicular não invasiva da tireoide com características nucleares papilíferas símile (NIFTP)” e não mais de “carcinoma” (4). A incorporação e o uso dessa nova nomenclatura pelos patologistas tendem a evitar tratamento excessivo e não indevidamente sobrecarregar os pacientes com diagnóstico de câncer e potencial acompanhamento ao longo da vida (18).

Os critérios diagnósticos de NIFTP foram revisados dois anos após a publicação inicial, a fim de evitar que sejam incluídos nessa classificação tumores com comportamento potencialmente mais agressivos. Foram então definidos critérios mais restritos, com considerações interpretativas importantes. O padrão arquitetural considerado passou a ser puramente folicular (100% de

folículos); o escore nuclear 2 ou 3, sendo ressaltado que as características nucleares na maioria dos casos são singelas e passa a ser necessária a avaliação histológica de todo o tumor a fim de excluir a presença de invasão da cápsula / vasos e a presença de papilas (7, 19).

Os carcinomas papilíferos menores ou iguais a 10,0 mm, também denominados microcarcinomas, não são considerados um subtipo distinto (3) e podem apresentar os mesmos padrões arquiteturais anteriormente descritos, inclusive serem encapsulados. Recentes estudos mostraram que tumores subcentimétricos com características semelhantes às descritas no trabalho do Nikforov et al. em 2016 (4), também têm prognóstico favorável, sendo então o conceito de NIFTP estendido para essas neoplasias (14, 20).

NIFTP foi incluído como uma nova entidade na quarta edição do livro da OMS de classificação de tumores de órgãos endócrinos publicado em 2017 (2) e na quinta edição de 2022 foram incluídos os subtipos subcentimétrico e oncocítico. A classificação de carcinoma papilífero folicular encapsulado então ficou restrita apenas àqueles tumores com invasão da cápsula e/ou com invasão vascular, sendo agora denominada carcinoma papilífero variante folicular encapsulada invasiva (3).

1.3 Fatores prognósticos do carcinoma papilífero da tireoide

O prognóstico de carcinoma papilífero da tireoide no geral é muito bom, com evidência de recorrência em cerca de 10% e morte em decorrência da doença em apenas 2% dos pacientes (21).

Fatores prognósticos associados ao carcinoma papilífero da tireoide incluem idade ao diagnóstico, sexo, tamanho do tumor, extensão extratireoidiana, ressecção completa da lesão e metástase à distância (22). Variáveis anatomopatológicas associadas com o prognóstico incluem subtipo do tumor, invasão vascular e metástase linfonodal (12, 23).

Sexo masculino, idade maior que 50 anos ao diagnóstico, ressecção incompleta da lesão e extensão extratireoidiana, definida como células neoplásicas em íntimo contato com tecido adiposo e/ou muscular esquelético peritireoidiano, são fatores de mau prognóstico para o carcinoma papilífero da

tireoide (12, 24). Em relação ao tamanho do tumor, quanto maior o tamanho ao diagnóstico, pior o prognóstico, sendo que tumores menores de 20,0mm apresentam menor taxa de recorrência na tireoide, linfonodo e metástase à distância (23).

Invasão vascular, tanto intratireoidiana como extratireoidiana, pode estar associada à metástase ao diagnóstico e com uma maior incidência de recorrência tumoral (25). A incidência de invasão vascular varia entre os estudos, estando entre 7,5 e 33% dos casos, e um fator significativo para sua presença é o subtipo do carcinoma papilífero analisado. Tumores histologicamente menos agressivos, como o papilífero clássico, apresentam incidência menor de invasão vascular (3,3%) quando comparados ao subtipo folicular (20,9%) e os subtipos de células altas e esclerosante difusa (26).

A invasão neoplásica vascular pode ocorrer em vasos linfáticos e/ou venosos e para ser valorizada nos carcinomas da tireoide precisa estar localizada em vasos da cápsula tumoral ou no parênquima adjacente à neoplasia (27, 28). Porém, particularmente para invasão vascular linfática, Hall *et al.* (29) mostraram que no carcinoma papilífero a caracterização de invasão neoplásica de vasos intratumorais associou-se com metástase para linfonodos regionais.

O carcinoma papilífero da tireoide tem tendência a ocasionar metástases pela via linfática, com acometimento de linfonodos cervicais em 40 a 60% dos casos (25). O acometimento linfonodal tem maior propensão de acontecer nos níveis cervicais III, IV e VI do que no nível II (30). Apesar de a metástase linfonodal não ter impacto na sobrevida, foi observado que a sua presença está associada à extensão extratireoidiana e aumento na taxa de recorrência local e metástase a distância (31). A Associação Americana de Tireoide recomenda que o esvaziamento cervical central (nível VI) deva acompanhar a tireoidectomia total quando há evidência clínica de linfonodo central acometido. A dissecação central profilática deve ser considerada quando o tumor primário tem estadió avançado (T3 e T4), quando há envolvimento do compartimento linfonodal lateral ou se a informação será útil para a decisão terapêutica posterior (30).

Para pacientes menores de 45 anos e com carcinoma papilífero estadió I foi visto que a presença de metástase linfonodal e o número de linfonodos acometidos comprometem a sobrevida. O acometimento de até 6 linfonodos foi

relacionado a uma queda da sobrevida, enquanto um número maior de linfonodos metastáticos não conferiu risco adicional de mortalidade (31).

Os subtipos histológicos potencialmente mais agressivos são os de células altas e de células colunares (2). No entanto, outros subtipos como esclerosante difusa, folicular infiltrativo e sólida são também correlacionados com um pior prognóstico (12).

O subtipo folicular encapsulado não invasivo, reclassificado como NIFTP, ao contrário, confere excelente prognóstico, com baixos índices de recorrência e de metástase linfonodal (4). Porém nem todos os artigos até o momento mostraram uma evolução completamente benigna do NIFTP, validando sua inicial classificação como tumor de baixo potencial de malignidade (tumor indolentes ou de baixo grau), classificação posteriormente endossada pela OMS.

Em relação ao microcarcinoma, os fatores clínico-patológicos associados a ocorrência de doença linfonodal são pacientes jovens, sexo masculino, tumor infiltrativo, multicêntrico, de maior tamanho ($\geq 5,0$ mm) e com extensão extratireoidiana. No entanto, o índice de recorrência tumoral é baixo, cerca de 3%, e ocorre principalmente nos pacientes com doença linfonodal avançada ao diagnóstico (32).

Metástase à distância é um evento raro, sendo os principais sítios acometidos o pulmão e ossos (33). Apesar de conferir um pior prognóstico, as lesões são responsivas ao tratamento com iodo radioativo (12).

1.4 Estadiamento

O estadiamento pós-operatório tem como objetivos: estimar o risco de mortalidade, determinar o risco de recorrência, avaliar a qualidade da cirurgia realizada, definir o tratamento inicial de forma individualizada, uniformizar a linguagem e facilitar a comunicação da equipe multidisciplinar envolvida no tratamento e acompanhamento dos pacientes (34).

Lang *et al.* (35) identificaram na literatura 17 sistemas diferentes de estadiamento para carcinomas diferenciados da tireoide ou para carcinoma. O primeiro sistema proposto para definição de grupos de risco para pacientes com carcinoma de tireoide foi o EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*), em 1979 (36). Tem como parâmetros de avaliação idade,

sexo, tipo de tumor (leva em consideração todos os tipos de carcinomas da tireoide, incluindo medular e anaplásico), extensão extratireoidiana e metástase a distância; dividindo os pacientes em 5 grupos de risco.

De todos os sistemas de estadiamento já propostos, quatro são os mais usados para carcinoma papilífero e carcinoma folicular da tireoide: TMN, AGES, MACIS e AMES (2). O TNM é o principal deles, inicialmente descrito em 1940 sendo sua última versão (oitava edição) reformulada em 2017. Este sistema é aprovado pela UICC (*International Union Against Cancer*) e pela AJCC (*American Joint Commission on Cancer*) e tem como parâmetros a extensão anatômica do tumor (T), o envolvimento de linfonodos regionais (N) e metástase a distância (M); dividindo os pacientes em quatro estadiamentos combinados (28). Este é o único estadiamento que é periodicamente revisado e atualizado.

O sistema AGES (*Age, Grade, Extent and Size*) foi formulado pela *Mayo Clinic* em 1987. Tem como parâmetros a idade, grau histológico do tumor, tamanho e extensão do tumor (37). A principal dificuldade no uso desse sistema é o fato de ter o grau histológico como parâmetro de avaliação, pois a maioria dos patologistas não gradua o carcinoma papilífero por se tratar na maior parte dos casos de tumores bem diferenciados (2).

O MACIS (*Distant Metastases, Age, Completeness of resection, Invasion, Size*) foi formulado pela *Mayo Clinic* como uma alternativa para o AGES e publicado em 1993. Tem como parâmetros de avaliação a presença de metástase à distância, idade, ressecção completa da lesão, invasão local e tamanho (38). Divide os pacientes em 4 grupos de risco a partir do uso de uma fórmula matemática calculada no *site* da *American Thyroid Association* (ATA) (39). O fato de as variáveis utilizadas neste sistema de estadiamento estarem disponíveis após a cirurgia torna esse sistema prognóstico acessível.

O último sistema de estadiamento mais utilizado é o AMES (*Age, Distant Metastasis, Extension and Size*) formulado em 1988. Os fatores prognósticos utilizados foram idade, metástase à distância, invasão extratireoidiana e tamanho. A idade e o tamanho do tumor foram expressos em variáveis categóricas em que 50 mm foi o valor de corte para tamanho e o valor de corte para a idade foi 41 anos para os homens e 51 para as mulheres. Os pacientes foram divididos em 2 grupos de risco (40).

É importante ressaltar que nenhum desses sistemas de estadiamento consideram o microcarcinoma separadamente ou levam em conta a variante histológica do carcinoma papilífero como fator prognóstico (35) ou testes moleculares realizados (30).

Os carcinomas papilíferos encapsulados que apresentam critérios histológicos adequados para serem classificados como NIFTP não devem ser estadiados pois não são mais considerados como carcinoma (41).

1.5 Aspectos epidemiológicos do carcinoma papilífero da tireoide

Dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da OMS revelaram que o número estimado de casos novos de câncer no mundo em 2020, excluídos os casos de tumores de pele não melanoma, foi de 18 milhões, e o número de mortes por câncer foi de 9,8 milhões.

Segundo estimativas do projeto GLOBOCAN, cujo objetivo é elaborar estatísticas contemporâneas da incidência e mortalidade de vários tipos de câncer em todos os países do mundo, em 2020, houve 586.202 casos novos de câncer de tireoide no mundo, sendo 137.287 em homens e 448.915 em mulheres, e 43.646 óbitos por esta neoplasia, sendo assim o nono tipo de câncer com maior incidência no mundo. No Brasil, em 2020, houve 30.607 casos novos de câncer de tireoide (nono tipo de câncer com maior incidência), sendo 6 094 em homens e 24.513 em mulheres (42, 43). Em sua maioria, os tumores são diagnosticados em pacientes na terceira, quarta e quinta décadas de vida (2).

Nas últimas duas décadas a incidência de carcinoma papilífero da tireoide nos Estados Unidos duplicou, sendo de 6,3 para cada 100.000 indivíduos em 2000 e de 12,7 para cada 100.000 indivíduos em 2019 (44). Em 2007 Kent *et al.* (45) propuseram que esse aumento da incidência poderia ser devido a melhoria da sensibilidade dos testes diagnósticos e não a um verdadeiro aumento da ocorrência de câncer de tireoide. Em 2009 Stanicic *et al.* (46) demonstraram que prevalência de nódulos da tireoide à ultrassonografia era muito maior que à palpação, sendo de 13,4 - 46% e 0,5 - 6,5%, respectivamente. Já em 2013 Li *et al.* (47) propuseram que a detecção melhorada provavelmente contribuiu para o aumento da incidência do câncer da tireoide nas últimas décadas, mas não pode explicar totalmente o aumento real observado. Em 2014 Jung *et al.* (48)

mostraram que a melhora dos métodos de detecção ocasionou o aumento da incidência de carcinomas subcentimétricos e que a uniformização dos critérios histológicos para o diagnóstico da variante folicular (encapsulada e/ou infiltrativa) do carcinoma papilífero a partir da década de noventa permitiu o aumento da incidência dessas variantes.

Resumidamente, a causa desse aumento deve ser interpretada como multifatorial, tendo como pilares a maior longevidade da população, fatores ambientais e de estilo de vida, além da maior vigilância (4).

O carcinoma papilífero é o carcinoma mais comum da tireoide, correspondendo a 80-85% das neoplasias malignas da glândula (49). Atualmente, mais da metade dos carcinomas papilíferos diagnosticados são nódulos menores ou iguais a 10,0 mm (50).

1.6 Fatores de risco ambientais associados ao carcinoma papilífero de tireoide

Os fatores de risco ambientais relacionados ao carcinoma papilífero da tireoide podem ser divididos em genotóxicos e não genotóxicos. Devido ao fato de a tireoide necessitar de iodo do ambiente para seu funcionamento, está sujeita a efeitos genotóxicos (dano do DNA) causado por iodo radioativo e a efeitos não genotóxico (aumento do TSH) causado pela deficiência de iodo (2).

O principal fator de risco ambiental é a exposição à radiação (51). Câncer de tireoide endêmico ocorreu entre aqueles expostos a níveis elevados de radiação a partir do acidente da central nuclear de Chernobyl em 1986 (2). O predomínio de carcinoma papilífero na população exposta está provavelmente relacionado com a capacidade da radiação de produzir quebras de DNA de cadeia dupla, precursoras necessárias dos rearranjos encontrados em muitos carcinomas papilíferos. Foi visto que diferenças na concentração de iodo na dieta da população nas áreas afetadas pelo acidente influenciou na morfologia do carcinoma papilífero. Os carcinomas papilíferos que se desenvolveram em crianças nas áreas com deficiência de iodo tinham fenótipo mais agressivo e menos diferenciado (mais áreas sólidas) do que os de áreas ricas em iodo (52).

A incidência global de câncer de tireoide não parece ser afetada pela ingestão de iodo a partir de fontes alimentares (53). A ingestão de iodo é

conhecida por influenciar na distribuição do tipo histológico do câncer da tireoide, com maior prevalência de carcinoma folicular nas áreas com deficiência de iodo, sendo o carcinoma papilífero mais frequente nas áreas em que há ingestão profilática de iodo (54).

A relação de outros fatores ambientais, como dieta, estilo de vida e poluentes ambientais com o câncer de tireoide ainda não foi comprovada (55).

1.7 Fatores genéticos associados ao carcinoma papilífero de tireoide

Os carcinomas papilíferos da tireoide frequentemente apresentam alterações genéticas que levam à ativação permanente da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), responsável por regular várias atividades celulares como expressão gênica, mitose, diferenciação celular, sobrevivência celular e apoptose. Essas alterações genéticas incluem mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS* e rearranjos do *RET/PTC*. Mutações envolvendo esses genes ocorrem em 70% dos carcinomas papilíferos e são mutuamente exclusivas (56, 57).

Diversos métodos moleculares são utilizados para detecção de mutações somáticas relacionadas ao câncer, tais como Sequenciamento de Sanger, PCR em tempo real, pirosequenciamento, sequenciamento de próxima geração, entre outros. Todos esses métodos exigem concentração e pureza suficientes de DNA, equipamentos especiais e pessoal qualificado (58-60). Alternativamente, anticorpos específicos para identificação das mutações nos genes *BRAF*^{V600E} e do *NRAS*^{Q61R} por exame imuno-histoquímico foram desenvolvidos. Apesar de tal pesquisa trazer a perspectiva de identificação das células mutadas diretamente em tecidos tumorais fixados em formaldeído e emblocados em parafina (61, 62), tais reações não entraram na prática diagnóstica, sendo necessários mais estudos para avaliação de sua eficácia em condições rotineiras de fixação e demais procedimentos dos laboratórios de patologia cirúrgica.

1.7.1 *BRAF*

A mutação do gene *BRAF* ocorre em cerca de 40-45% dos carcinomas papilíferos, sendo dessa forma a alteração genética mais prevalente (63). A

mutação encontrada é quase exclusivamente a transversão da timina pela adenina (T1799A) no éxon 15, com substituição da valina (V) pelo glutamato (E) no códon 600 da proteína (V600E). É uma mutação somática que leva a ativação contínua da via MAPK (64).

Esta mutação é mais frequente nos subtipos histológicos de células altas, compreendendo 70% dos casos, e no subtipo clássico em aproximadamente 60% dos casos (64, 65). Casos de subtipo clássico em que a neoplasia apresenta padrão arquitetural misto, com pelo menos 50% de folículos e o remanescente de papilas, também apresentam maior prevalência de mutação *BRAF*^{V600E}. Isso demonstra que a formação de papilas, mesmo que em mínima proporção, deva estar associada à mutação *BRAF* (66).

A mutação *BRAF*^{V600E} é um evento raro na variante folicular do carcinoma papilífero, compreendendo cerca de 12% dos casos. No entanto, quando estudados especificamente os carcinomas papilíferos variante folicular não encapsulados e infiltrativos, a incidência desta mutação passa a ser de 26%, aproximando estas lesões molecularmente do subtipo clássico (67). Esta mutação também pode ser encontrada em carcinomas anaplásicos e pouco diferenciados da tireoide originários de carcinomas papilíferos (68).

Como a mutação *BRAF*^{V600E} não é encontrada em carcinomas foliculares ou nos nódulos tireoidianos benignos, sua detecção pode representar um marcador específico de carcinoma papilífero (69).

A presença de mutação *BRAF*^{V600E} foi correlacionada com maior agressividade do tumor em muitos estudos, como extensão extratireoidiana, estadiamento avançado ao diagnóstico, recorrência tumoral, metástase linfonodal ou à distância (70). Também foi considerado um preditor independente de recorrência até mesmo em pacientes com tumores intratireoidianos (71).

Apesar de ainda persistir controvérsia, a presença de mutação *BRAF*^{V600E} nos microcarcinomas papilíferos (tumores ≤ 10,0 mm) foi correlacionada com características histológicas de maior agressividade como bordas infiltrativas do tumor, propagação intratumoral da neoplasia, metástase linfonodal ao diagnóstico e extensão tireoidiana (30).

1.7.2 RAS

Mutações pontuais no gene *RAS*, que incluem os genes *KRAS*, *HRAS* e *NRAS*, são encontradas nos carcinomas foliculares, carcinomas papilíferos e adenomas foliculares. Entre essas mutações, a mais frequente é a substituição de adenina por guanina (CAA>CGA) (A182G) na sequência do gene *NRAS* no éxon 3, levando à modificação de aminoácidos da glutamina (Q) para arginina (R) no códon 61 da proteína (Q61R) (69, 72).

Os carcinomas papilíferos apresentam esta mutação em 15 a 20% dos casos e são sempre do subtipo folicular (69). Esses tumores são habitualmente encapsulados, apresentam características nucleares menos proeminentes e focais, maior tamanho ao diagnóstico e com menores taxas de metástase linfonodais e à distância (65). Exibem perfil molecular e comportamento semelhante ao espectro adenoma/carcinoma folicular, determinando em termos práticos um tumor indolente na ausência de invasão capsular e vascular (67). Nesta última situação, os tumores são atualmente classificados como NIFTP (4).

A detecção da mutação *RAS* em nódulo tireoidiano é uma evidência forte de neoplasia, apesar de não estabelecer, por si só, o diagnóstico de malignidade (73). Diante disso, tem-se tentado melhorar a acurácia diagnóstica dos casos de punção aspirativa de nódulos tireoidianos com diagnóstico indeterminado através da realização de teste molecular do aspirado citológico incluindo um painel de genes (*BRAF*, *RAS*, *RET/PTC* e *PAX8-PPARY*) que são mutuamente exclusivos e encontrados em 70 a 80% dos carcinomas da tireoide (74).

A mutação *RAS* foi a mutação mais encontrada nas citologias indeterminadas (72% dos casos) em estudo de 2011 realizado por Nikiforov *et al.* (75). Aquele estudo mostrou que 85% dos casos com mutação *RAS* apresentaram carcinoma. Esse fato pode alterar potencialmente o manejo cirúrgico desse grupo de pacientes, que passam a ser fortes candidatos para tireoidectomia total, mesmo levando em consideração a possibilidade de lesões benignas, como o adenoma folicular, poderem apresentar essa mutação (74).

1.7.3 *RET/PTC*

O proto-oncogene *RET* é localizado no braço longo do cromossomo 10 e codifica o receptor de membrana tirosina-quinase. A ativação do *RET* estimula as vias da MAPK e PI3K que promovem o crescimento, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (76, 77).

Na glândula tireoide, o *RET* é expresso nas células C parafoliculares da tireoide e não nas células foliculares, onde pode ser ativado pelo rearranjo cromossômico conhecido como *RET/PTC*. Pelo menos 13 tipos de rearranjos já foram descritos, todos formados pela fusão da porção 3' do gene *RET* (localizado no cromossomo 10) com a porção 5' de diversos genes heterólogos. Os dois tipos de rearranjos mais comuns, *RET/PTC1* e *RET/PTC3*, perfazem a maioria dos rearranjos encontrados no carcinoma papilífero da tireoide (56, 78).

Rearranjos do *RET/PTC* são encontrados em 10 a 20% dos carcinomas papilíferos esporádicos, ocorrendo com maior frequência nos pacientes com história de exposição à radiação (50-80%), crianças e jovens (40-70%) (69).

Carcinomas papilíferos com este rearranjo habitualmente apresentam as características nucleares na maior parte das células, são observados muitos corpos psamomatosos no meio da lesão, apresentam padrão arquitetural papilar e alta incidência de metástase linfonodal (65). Nos pacientes expostos à radiação, o rearranjo *RET/PTC3* está relacionado à variante sólida e o *RET/PTC1* à variante clássica. Na população geral, essa correlação genotípica - fenotípica ainda não está bem estabelecida (69).

Assim como observado na mutação do gene *RAS*, o rearranjo *RET/PTC* pode ser encontrado em nódulos benignos da tireoide e em casos de tireoidite de Hashimoto. Esse fato coloca em questão o valor clínico / prognóstico da identificação deste rearranjo em exames moleculares para avaliação de citologias com diagnóstico indeterminado visando programação terapêutica (77).

Outras alterações genéticas que podem ser encontradas no carcinoma papilífero da tireoide são: *PAX8/PPAR γ* , que ocorre em menos de 5% dos tumores subtipo folicular e conferem bom prognóstico (63, 79), *TERT* e *TP53* que conferem aparentemente uma maior taxa de recorrência tumoral e mortalidade (30). A ocorrência de mais de uma mutação é raramente encontrada nos carcinomas papilíferos, no entanto foi evidenciada associação de *BRAF* e

RET/PTC em alguns casos de recorrência tumoral, o que poderia estar associado a fenótipo mais agressivo da neoplasia cuja lesão primária apresentava mutação apenas para *BRAF* (80).

1.8 Transição epitélio-mesênquima

Transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo biológico que capacita células epiteliais polarizadas, que interagem com a membrana basal, a adquirir fenótipo mesenquimal, ou seja, apresentem capacidade de migração, invasão, resistência elevada à apoptose e aumento de produção de matriz extracelular. A TEM é iniciada e atinge sua conclusão devido a ocorrência de inúmeros processos moleculares tais como ativação de fatores de transcrição, expressão de proteínas de superfície, reorganização e expressão de proteínas do citoesqueleto, produção de enzimas de degradação da matriz extracelular e expressão de microRNAs específicos.

A TEM pode ser dividida em três subtipos. O tipo 1 está associado com a implantação, formação do embrião e desenvolvimento dos órgãos. O tipo 2 está envolvido na cicatrização de feridas, regeneração tecidual e fibrose tecidual. A fibrose tecidual é, em essência, uma forma ininterrupta de cicatrização de feridas devido à inflamação persistente. O tipo 3 ocorre em células neoplásicas que previamente já sofreram alterações genéticas e epigenéticas, especificamente em genes que propiciam a proliferação celular (crescimento clonal) e o desenvolvimento de tumor localizado. Tais células passam a ter a capacidade de invadir a membrana basal, considerada a fase precursora deste processo de múltiplas etapas, que pode culminar com a disseminação metastática.

O espectro de agentes sinalizadores que contribuem para a TEM nas células dos carcinomas ainda não está totalmente esclarecido. Uma das propostas é que as alterações genéticas e epigenéticas sofridas pelas células neoplásicas na formação do tumor primário as tornariam responsivas aos sinais indutores da TEM originados no estroma associado ao tumor, sendo os principais TGF- β (fator de transformação do crescimento beta), HGF (fator de crescimento do hepatócito) e EGF (fator de crescimento epidérmico). Tais sinais parecem ser responsáveis pela ativação de fatores de transcrição indutores da TEM nas

células neoplásicas, principalmente *Snail*, *Slug*, ZEB-1 e *Twist*. A ativação do processo também é facilitada pela destruição das junções celulares e das junções célula-matriz extracelular.

As células carcinomatosas, ao adquirirem o fenótipo mesenquimal, passam a expressar marcadores mesenquimais como alfa-actina de músculo liso, desmina e Vimentina (proteínas de citoesqueleto), ao mesmo tempo que perdem a expressão de moléculas de adesão como a E-caderina (proteína de superfície celular) e β -catenina. Estas células tipicamente são identificadas no fronte de invasão tumoral, e são tidas como as células que iniciam etapas da cascata “invasão-metástase”, como por exemplo, invasão vascular, transporte pela circulação, saída do vaso, formação de micrometástase e finalmente colonização (macrometástase).

Para que a colonização ocorra, é necessário que as células neoplásicas percam seu fenótipo mesenquimal e readquiram suas características epiteliais, via transição mesênquimo-epitelial (TME). Esse processo reverso possivelmente é reflexo do novo microambiente no qual as células neoplásicas irão se instalar, que não apresenta os sinais que induziram a TEM no sítio primário (81, 82).

1.8.1 Transição epitélio-mesênquima no carcinoma papilífero de tireoide

A TEM está associada à perda da polaridade e coesividade celular. No carcinoma papilífero da tireoide, a perda da polaridade é caracterizada pela presença de papilas revestidas por células com núcleos apicais e citoplasma escasso (padrão *hobnail*) ou estruturas foliculares irregulares recobertas por células pequenas, redondas e achatadas, sem colóide luminal. Já a perda de coesividade é caracterizada pela presença de células isoladas ou arranjadas em pequenos grupos lembrando histiócitos espumosos ou formando micropapilas. Essas características são identificadas no fronte de invasão de alguns tumores, que é definido como a interface entre a neoplasia com características invasivas e o parênquima não neoplásico, frequentemente exibindo desmoplasia (83).

Fatores de transcrição correlacionados com a TEM foram pouco estudados em carcinomas papilíferos bem diferenciados. Alguns estudos observaram que fatores de transcrição como ZEB-1, *Smad7*, *Slug* e *Snail* não demonstraram aumento da expressão de forma significativa nos carcinomas bem

diferenciados em comparação com carcinomas anaplásicos (pouco diferenciados) da tireoide (84, 85).

Até onde pudemos verificar, a expressão de marcadores da TEM não foi estudada em neoplasia encapsuladas da tireoide. No presente estudo foram estudados as seguintes proteínas e fatores de transcrição:

1.8.1.1 E-caderina

As caderinas compreendem uma grande família de glicoproteínas transmembranares dependentes de cálcio que medeiam a adesão celular (*calcium-dependent adhesion molecules*) (86). A E-caderina é a proteína de adesão encontrada nas células epiteliais, localizada na superfície basolateral da célula. É codificada pelo gene CDH1 localizado no cromossomo 16q22.1, sofre vários processos de corte até se transformar na molécula madura que apresenta três domínios: o domínio extracelular, o domínio transmembranar de passagem única e o domínio citoplasmático que é o local de interação com as moléculas de catenina que medeiam sua ligação ao citoesqueleto de actina formando o complexo E-caderina – catenina (87) (Figura 2).

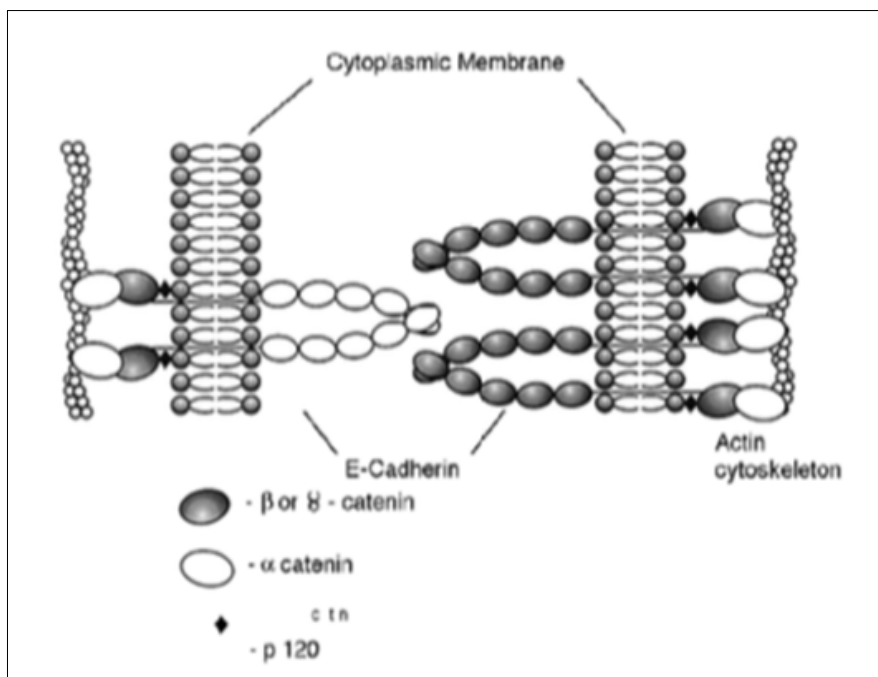


Figura 2 - Complexo E-caderina – catenina (Retirado de Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. Eur J Cancer. 2000;36(13 Spec no:1607-20) (87)

A E-caderina contribui para manter a diferenciação epitelial de duas maneiras: primeiro estabelecendo adesão célula-célula e polarização ápico-basal, e segundo, atuando como regulador negativo da sinalização Wnt ativa, como veremos no tópico seguinte sobre a β -catenina (88).

A redução da adesão celular é um fator importante no desenvolvimento de metástases tumorais e parece estar relacionada com vários mecanismos que interferem no complexo E-caderina-catenina. Estes incluem redução ou perda de expressão de E-caderina, mutação ou transcrição reduzida dos genes das moléculas constituintes, redistribuição de E-caderina para diferentes locais dentro da célula e competição por sites de ligação de outras proteínas. A hipóxia também tem um papel importante nesse processo (87).

A expressão imuno-histoquímica normal de E-caderina é visualizada como marcação que delinea a membrana celular (89). Tal expressão correlaciona-se com a diferenciação epitelial e sua perda associa-se a aumento da capacidade de invasão tumoral (90).

1.8.1.2 β -catenina

A β -catenina é uma proteína multifuncional, com papel importante na adesão celular e na transdução de sinais (91). Na membrana celular, juntamente com as outras cateninas (α -catenina, γ -catenina e p120-catenina), liga a E-caderina ao citoesqueleto de actina, mantendo a estabilidade da membrana e a adesão celular. No citoplasma, a β -catenina regula a diferenciação e proliferação celular por meio da via do Wnt/ β -catenina. Essas duas funções são consideradas na maior parte das vezes independentes (92).

Em condições normais, a β -catenina livre no citoplasma é rapidamente fosforilada pelo glicogênio sintase quinase 3β (GSK- 3β) no complexo adenomatose polipose coli (APC)-axina-GSK- 3β e é subsequentemente degradada pela via ubiquitina-proteassoma. Se o supressor tumoral APC não é funcional, como em muitas células neoplásicas do cólon, ou se a atividade da GSK- 3β é bloqueada pela via de sinalização Wnt ativada, a β -catenina não é fosforilada e se acumula em níveis elevados no citoplasma. Posteriormente, transloca-se para o núcleo, onde se liga a genes-alvo principalmente genes

implicados na proliferação celular e na progressão tumoral (via de sinalização β -catenina/TCF) (93).

Outra forma de regulação da via de sinalização β -catenina/TCF se faz por meio do complexo E-caderina-catenina, já que a E-caderina se liga a parte das moléculas de β -catenina presentes no citoplasma. Quando há perda da E-caderina e desmontagem do complexo de adesão celular, as cateninas são liberadas e se acumulam no citoplasma, sendo assim uma forma de estimular a via β -catenina/TCF (94).

Ativação constitutiva da via de sinalização Wnt/ β -catenina induzida por mutações de genes ou ativação aberrante de receptores Wnt, desencadeia o processo carcinogênico no cólon, fígado, pele, mama, medula óssea entre outros e o desenvolvimento de metástase. Estratégias terapêuticas direcionadas a essa via de sinalização estão sendo cada vez mais propostas para ajudar no combate ao câncer (95).

No tecido tireoidiano normal, a marcação imuno-histoquímica da β -catenina ocorre na membrana do epitélio folicular. No carcinoma papilífero existem três padrões de marcação observados: membrana, citoplasma e núcleo, refletindo a multifuncionalidade da β -catenina (adesão celular e transdução de sinais) (96). A perda da expressão em membrana, com ganho de expressão em citoplasma e núcleo podem ser observadas em células neoplásicas envolvidas no processo de TEM (97).

1.8.1.3 Vimentina

A Vimentina é uma importante proteína do citoesqueleto que faz parte da família dos filamentos intermediários (FI): os tipos I e II compreendem as citoqueratinas ácidas e básicas (presentes predominantemente nas células epiteliais), o tipo III tem como principais modelos a Vimentina (presente nas células mesenquimais e em alguns tipos específicos de células epiteliais) e a desmina (presente nas células musculares), o tipo IV é representado pelo neurofilamentos (presente nos neurônios), o tipo V corresponde às lamininas, presentes nos núcleos das células e o tipo VI é representado pelas nestinas (presentes nos neurônios embrionários). Apesar de a Vimentina ser o FI tipicamente encontrado nas células mesenquimais, a sua presença nas células

epiteliais foi relatada em alguns carcinomas, incluindo, dentre outros, os carcinomas de tireoide, rim e adrenal (98).

O padrão de marcação imuno-histoquímica da Vimentina nas células mesenquimais é citoplasmático. Na tireoide, sua expressão nas células epiteliais é localizada junto à região basal da célula (subnuclear), e sua expressão foi identificada focalmente no parênquima normal, com expressão crescente em processos patológicos não neoplásicos, atingindo superexpressão nos carcinomas (99).

A expressão de Vimentina nas células epiteliais está mais bem caracterizada no processo de TEM. Porém, é igualmente possível que eventos tumorigênicos, incluindo migração e invasão de células tumorais, sejam consequência da superexpressão de Vimentina em células cancerosas (98). A compreensão deste fenômeno no contexto dos subtipos de carcinomas tireoidianos ainda requer maiores estudos.

1.8.1.4 Zinc finger E-box binding homeobox (ZEB) 1 e 2

Os fatores de transcrição ZEB-1 e 2 pertencem à família ZEB (*zinc finger E-box binding homeobox*), podendo regular negativamente ou positivamente a expressão dos seus genes alvo. Estão implicados na supressão de diversos reguladores de polaridade epitelial e consequentemente envolvidos na TEM e invasão (100). A superexpressão de ZEB-1 em carcinomas pancreáticos, gástricos e hepáticos entre outros, por exemplo, pode ligar-se diretamente ao *E-box* localizado no promotor de CDH1, o gene que codifica a E-caderina, levando à repressão da transcrição de CDH1, indução da transição epitélio-mesênquima e progressão da neoplasia (101).

A expressão imuno-histoquímica de ZEB-1 e ZEB-2 é nuclear. No tecido não neoplásico o ZEB-1 é expresso principalmente nas células estromais e mesenquimais, como por exemplo no estroma endometrial e ovariano, nos adipócitos da mama e principalmente em células musculares lisas, cardiomiócitos e células musculares esqueléticas. O ZEB-2 tem expressão menos intensa nas células estromais dos tecidos e mais proeminente nos adipócitos da mama, células hematopoiéticas da medula óssea, células gliais e hepatócitos (102).

Nas neoplasias, a expressão imuno-histoquímica de ZEB-1 e ZEB-2 pode ser observada nas células epiteliais tumorais ou nas células estromais, mais precisamente nos fibroblastos associados ao câncer (CAF) (103). A expressão desses fatores de transcrição já foi observada em diversos tipos de câncer entre eles de útero, pulmão, pâncreas, fígado, estômago, cólon e mama. Nesses tumores, a expressão de ZEB-1 correlaciona-se com perda da E-caderina, com doença avançada e com a presença de metástase (101, 104).

Em nossa pesquisa bibliográfica, encontramos apenas um estudo abordando a expressão imuno-histoquímica de ZEB-1 em neoplasias da tireoide. A expressão de ZEB-1 em carcinomas papilíferos (subtipos clássicos e células altas) e carcinomas foliculares da tireoide foi ali relatada como apresentando associação positiva significativa com estadiamento avançado, metástase linfonodal e metástase à distância. No entanto, apesar daqueles autores atribuírem tal relação à expressão de ZEB-1 no epitélio tumoral, a foto publicada como Figura 1 mostra reatividade que atribuiríamos ao estroma, dificultando nossa interpretação quanto à mensagem ali exposta (105).

1.9 Justificativa e resultados esperados

Motivados pela recente identificação da evolução mais favorável de neoplasias encapsuladas definidas como NIFTP e pela discussão envolvendo a quantidade de formação de papilas na neoplasia tolerável na definição desta entidade (4, 7, 19), delineamos o presente estudo visando a obter um melhor entendimento de aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e moleculares das neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero e variável presença de estruturas papilares. Nossa expectativa é que esta abordagem permita caracterizar mais alguns detalhes destas neoplasias, inclusive os tumores subcentimétricos que são os mais frequentemente diagnosticados na atualidade.

Nossa hipótese é que a porcentagem de formação de papilas e presença de infiltração da cápsula tumoral sejam aspectos morfológicos importantes que podem determinar características histológicas com significado prognóstico nestes tumores, e muito provavelmente estejam associados a perfis moleculares mais agressivos. Acreditamos que para ocorrer a infiltração da cápsula, as

células neoplásicas tenham que perder parte das suas características epiteliais e ganhem algumas características mesenquimais, através do processo de transição epitélio-mesênquima, o que possivelmente ocorra de modo diferente nas diversas regiões da neoplasia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Estudar as neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero quanto a distribuição de variáveis clínicas e anatomopatológicas, tendo em vista principalmente determinar quais variáveis estão associadas às características histológicas com significado prognóstico (invasão vascular e metástase linfonodal).
- Pesquisar a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais ligados à TEM nas diferentes regiões tumorais, com o objetivo de entender as propriedades das células neoplásicas relacionadas com a presença ou ausência de infiltração capsular.
- Classificar os tumores de acordo com as mutações dos genes *BRAF^{V600E}* e *NRAS^{Q61R}*, mutações mais frequentes do carcinoma papilífero da tireoide.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a associação entre o padrão arquitetural da neoplasia (porcentagem estimada de formação de papilas) e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas;
- Analisar a associação entre infiltração da cápsula e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas;
- Analisar a associação entre o tamanho do nódulo com as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas;
- Comparar a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais ligados à TEM nos focos de infiltração da cápsula e nas áreas não infiltrativas do tumor (região central e região periférica junto à cápsula);
- Analisar associações entre a presença de mutação dos genes *BRAF^{V600E}* e *NRAS^{Q61R}* com as variáveis clínicas e anatomopatológicas e ocorrência de TEM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética em pesquisa

O protocolo de pesquisa deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/06/2017, sob número do Parecer 2.209.259, com registro CAAE na Plataforma Brasil número 67834417.4.0000.0065. Houve também aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, como instituição coparticipante, em sessão de 09/10/2017, sob número do Parecer 2.321.725, com registro CAAE na Plataforma Brasil número 67834417.4.3001.0070.

3.2 Casuística

Trata-se de estudo retrospectivo, sem intervenção diagnóstica e sem intervenção terapêutica, realizado no Laboratório CICAP – Centro de Imuno-histoquímica, Citopatologia e Anatomia Patológica, localizado nas dependências do Hospital Alemão Oswaldo Cruz (HAOC) e no LIM-14 - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

A partir de pesquisa em banco de dados do laboratório CICAP foram inicialmente selecionados 224 pacientes com diagnóstico de carcinoma papilífero com relato de presença de cápsula no período de 1º de janeiro de 2001 a 31 de dezembro de 2015. Esses casos foram revistos pela autora, com supervisão de seu orientador.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Nódulos envoltos por 100% de cápsula, seja esta íntegra ou permeada pela neoplasia (1, 15-17)
- Presença de características nucleares definidoras de carcinoma papilífero (4, 5)
- Disponibilidade de blocos de parafina e de lâminas nos arquivos do laboratório CICAP

3.2.2 Critérios de exclusão

- Presença de outros nódulos (encapsulados ou não) com diagnóstico de carcinoma, independentemente do tamanho;
- Presença de características de carcinoma pouco diferenciado tais como (30):
 - áreas sólidas, trabeculares ou insulares
 - perda das características nucleares de carcinoma papilífero
 - núcleos convolutos (evidência de perda parcial da diferenciação em carcinomas papilíferos), focos de necrose ou aumento da atividade mitótica (3 ou mais mitoses em 10 campos de grande aumento)

3.2.3 Seleção dos casos

Dos 224 pacientes com diagnóstico de carcinoma papilífero com relato de presença de cápsula, foram excluídos 4 porque os blocos de parafina haviam sido retirados com outras finalidades, 10 por não apresentarem neoplasia remanescente no bloco de parafina, 7 por possuírem cápsula incompleta ou apresentarem bordas mal definidas/infiltrativas, 52 por apresentarem cápsula incompleta e neoplasia multifocal, 48 por apresentarem mais de um nódulo (encapsulado ou não) com diagnóstico de carcinoma.

A casuística final do estudo consiste, portanto, em 103 pacientes, compreendendo 49 pacientes com nódulos maiores de 10,0 mm e 54 pacientes com nódulos menores ou iguais a 10,0 mm (Figura 3).

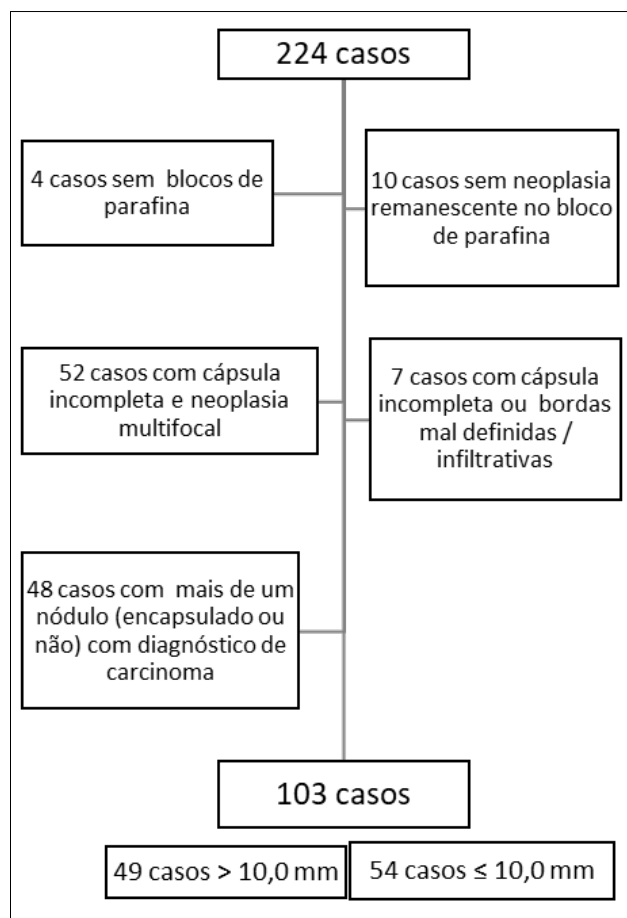


Figura 3 - Fluxograma dos casos incluídos no estudo

3.2.4 Obtenção de dados clínicos

O gênero, a idade do paciente no momento da cirurgia, tipo de cirurgia realizada (tireoidectomia total ou lobectomia), o tamanho e a localização da neoplasia foram obtidos através de revisão dos relatórios anatomopatológicos.

3.2.5 Análise das características anatomopatológicas

As seguintes variáveis anatomopatológicas foram avaliadas através da revisão dos cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE) efetuada pela autora, sob supervisão de seu orientador:

- **espessura da cápsula:** a espessura da cápsula foi medida em milímetro através do uso do software OPTHD 3.7, versão x64, 3.7.13270.20181102.
- **infiltração da cápsula:** como para o carcinoma papilífero encapsulado não existe uma descrição formal de como se identificar corretamente a infiltração da cápsula, baseamo-nos no presente trabalho nos critérios definidos por

Chan (27) para o carcinoma folicular da tireoide (Figura 4). A infiltração intracapsular é aquela restrita à cápsula, dessa forma a neoplasia não atinge o parênquima adjacente. A infiltração transcapsular é aquela que a neoplasia ultrapassa os limites da cápsula e atinge o parênquima adjacente. Definimos a infiltração da cápsula tumoral como presente quando observamos tanto infiltração intra como transcapsular.

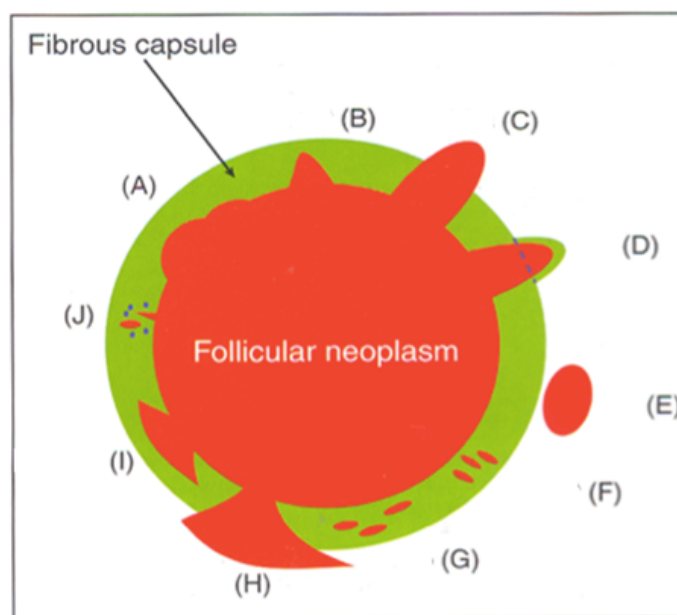


Figura 4 – Infiltração da cápsula. A, B e I: Invasão intracapsular. C, D, E e H: Invasão transcapsular. F: células neoplásicas isoladas alinhados perpendicularmente à cápsula, não considerada infiltração da cápsula. G: células neoplásicas isoladas alinhadas de forma paralela à cápsula, não considerada infiltração. J: Células neoplásicas na cápsula envolvidas por processo inflamatório, não considerada infiltração (Retirado de Chan J. Diagnostic Histopathology of Tumours. 4rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2013. Chapter 18: Tumors of the Thyroid and Parathyroid Glands) (27)

- **Padrão arquitetural:** a porcentagem de formação de papilas foi avaliada e estimada em 0 a 100% (estimativas feitas em escalas de 10%), tendo em vista as evidências prévias de associação desta porcentagem com características histológicas e moleculares com significado prognóstico (106). Posteriormente os casos foram divididos em quatro grupos para análise estatística: tumores com formação de 0% de papila (ou seja, puramente foliculares), tumores com até 50% de papila, tumores com 60% a 90% e tumores com 100% de papila (puramente papilares).

- **Fibrose intratumoral:** determinada como ausente ou presente, definida pelo achado histológico de fibrose em meio à neoplasia (107).
- **Processo inflamatório crônico intratumoral:** determinado como presente ou ausente a ocorrência de infiltrado inflamatório mononuclear no estroma intratumoral.
- **Invasão neoplásica vascular (linfática e venosa):** determinada como presente ou ausente, definida como presença de células neoplásicas no interior de espaços vasculares com revestimento endotelial inequívoco. O foco de invasão só foi considerado se localizado na cápsula tumoral ou no parênquima adjacente à neoplasia. Invasão em vasos intratumorais não foram considerados (28). Nos casos com presença de invasão neoplásica vascular, realizamos exame imuno-histoquímico para D2-40 para auxiliar na distinção entre invasão vascular linfática e vascular venosa.
- **Presença de extensão extratireoidiana:** determinada como presente ou ausente, definida como envolvimento do tecido peritireoidiano pela neoplasia primária.
- **Número de linfonodos analisados**
- **Metástases linfonodais:** determinada como presente ou ausente, definida como depósitos de carcinoma papilífero no parênquima linfonodal.

3.3 Reações imuno-histoquímicas

Os anticorpos utilizados no estudo, descritos com detalhes na Tabela 1, compreendem aqueles que detectam a presença de proteína mutada *BRAF^{V600E}* e *NRAS^{Q61R}* e moléculas de adesão (E-caderina e β -catenina), proteínas do citoesqueleto (Vimentina) e fatores de transcrição (ZEB-1 e ZEB-2) relacionadas à TEM.

E-caderina e β -catenina são proteínas de adesão normalmente expressas em membrana, cuja perda ou diminuição da expressão demonstra que as células neoplásicas epiteliais adquiriram fenótipo mesenquimal (90). No caso da β -catenina, a presença de padrão anômalo citoplasmático e nuclear também demonstra a aquisição de características mesenquimais (97). A Vimentina,

proteína do citoesqueleto, é normalmente expressa nas células mesenquimais no padrão citoplasmático difuso (“padrão mesenquimal”) e nas células epiteliais tireoidianas, com superexpressão no carcinoma, no padrão citoplasmático basal (subnuclear) (“padrão epitelial”). O ganho de expressão citoplasmática difusa nas células epiteliais neoplásicas é atribuído a aquisição de fenótipo mesenquimal (81). Os fatores de transcrição ZEB-1 e ZEB-2, são indutores da TEM, cujo ganho de expressão nuclear nas células epiteliais demonstra sua ativação (103).

Uma lâmina silanizada com corte representativo com espessura de 3 µm de cada um dos nódulos estudados foi submetida a reação imuno-histoquímica com cada um dos anticorpos listados na Tabela 1. As reações referentes aos anticorpos relacionados a TEM e pesquisa da proteína mutada *NRAS^{Q61R}* foram padronizadas e realizadas no LIM-14 - Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), pela farmacêutica Alda Wakamatsu. As reações para pesquisa da proteína mutada *BRAF^{V600E}* foram padronizadas e realizadas na Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do Hospital das Clínicas-FMUSP (HCFMUSP), sob supervisão da Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira. Os procedimentos imuno-histoquímicos estão descritos abaixo e a Tabela 2 resume a padronização das reações para cada um dos anticorpos.

Tabela 1 - Detalhamento das reações imuno-histoquímicas

Antígeno	Clone	Anticorpo Mono/poli	Marca	Código	Realização
E-caderina	36B5	mouse mAb	Leica Novocastra	NCL-L-E-Cad	LIM-14, FMUSP
Vimentina	V9	mouse mAb	Genemed	61-0066 RUO	LIM-14, FMUSP
ZEB-1	CL0151	mouse mAb	SIGMA	AMAB 90510	LIM-14, FMUSP
ZEB-2	OTI1E12	mouse mAb	OriGene	TA802113	LIM-14, FMUSP
β- catenina	MAB 14	mouse mAb	BD	610154	LIM-14, FMUSP
BRAF	V600E(VE1)	mouse mAb	Ventana	7605095	DAP – HC/FMUSP
NRAS (Q61R)	SP174	rabbit mAb	Abcam	ab227658	LIM-14, FMUSP

Tabela 2 - Resumo da padronização das reações imuno-histoquímicas

Antígeno	Recuperação antigênica	Título	Revelação	Controle positivo	Resultado
E-caderina	panela a vapor pH=6,0	1:200	Novolink	Carcinoma papilífero clássico da tireoide	Membrana
Vimentina	panela a vapor pH=9,0	1:800	Novolink	Adrenal normal e mucosa cólica	Citoplasmático basal (subnuclear) e citoplasmático difuso
ZEB-1	panela a vapor pH=9,0	1:1000	Novolink	Carcinoma urotelial de alto grau	Nuclear
ZEB-2	panela a vapor pH=9,0	1:400	Novolink	Carcinoma urotelial de alto grau	Nuclear
β- catenina	panela a vapor pH=6,0	1:200	Novolink	Tonsila palatina	Membrana, citoplasma e núcleo
BRAF	ULTRA CC1 pH=8,4	Pronto para uso	OptiView	Adenocarcinoma cólon	Citoplasma granular
NRAS (Q61R)	panela a vapor pH=9,0	1:200	Novolink	Melanoma Maligno	Citoplasma granular

3.3.1 Detalhamento do procedimento imuno-histoquímico

3.3.1.1 Procedimentos realizados no LIM-14

Inicialmente foi realizada a desparafinização dos cortes de 3 µm de espessura, do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60 °C por 20 minutos, seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir foi realizada a hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada. Posteriormente foi realizada a recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de tampão citrato pH 6,0 (PMB1-125) *Spring Bioscience*, ou solução tampão Tris-EDTA, pH 9,0 (PMB4-125) *Spring Bioscience*, em panela a vapor (após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação, colocada o suporte de lâminas) por 35 minutos. Após esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente foram feitas lavagens em água corrente e água destilada. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Após foram feitas lavagens em água corrente e água destilada, além de lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. Em seguida foi realizado bloqueio de proteínas com *Cas Block™ (Invitrogen by Life Technologies)* cat. nº 00-8120 por 10 minutos a 37 °C. Realizada Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução

de albumina bovina (BSA) (*SIGMA, EUA*) a 1,0% e azida sódica NaN_3 (*Inlab, São Paulo*) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37 °C e, em seguida, 18 horas (*overnight*) a 4 °C, com lavagens sequenciais em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada. Realizada incubação com o bloqueador pós-primário (*Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltd*), Ref. RE7 159, por 30 minutos a 37 °C, com posterior lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada. Realizada incubação com *NovoLink (Polimer, Leica Biosystems, Newcastle Ltd)*, Ref. RE7 161, por 30 minutos a 37 °C, com posterior lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada. Segue-se a revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (*Sigma, EUA*) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (*Labsynth*) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C, seguida de lavagens em água corrente e água destilada. Foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada, imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada. Posteriormente foi feita a desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (*Entellan, Merck*) com lamínula. Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem um controle positivo sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS em substituição ao anticorpo primário.

3.3.1.2 Procedimentos realizados na Divisão de Anatomia Patológica, Hospital das Clínicas – FMUSP

Foi utilizada metodologia automatizada através do equipamento *BenchMark Ultra* da Ventana. A recuperação antigênica foi feita com a solução *ULTRA Cell Conditioning* (Ultra CC1), marca Ventana, com pH de 8,4. O tempo de recuperação foi de 164 minutos a temperatura de 95 °C. O anticorpo primário VE1 (pronto para uso) teve tempo de incubação de 32 minutos a 37 °C. A amplificação foi feita com o *Kit OptiView Amplification* da marca Ventana, pronto para uso, com tempo de incubação de 8 minutos a temperatura de 37 °C. Para

a revelação foi utilizado *Kit* de detecção *OptiView DAB IHC Detection* da marca Ventana, pronto para uso, com tempo de incubação de 30 minutos a temperatura de 37 °C. A contra-coloração com Hematoxilina pronta para uso da marca Ventana, com tempo de incubação de 12 minutos a temperatura de 37 °C. Posteriormente foi realizada montagem em meio permanente (*Entellan, Merck*) com lamínula. Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem um controle positivo sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo.

3.3.2 Avaliação dos estudos imuno-histoquímicos

3.3.2.1 Proteínas relacionadas à TEM

A avaliação da expressão das proteínas relacionadas à TEM nas células neoplásicas foi realizada em diferentes regiões do mesmo nódulo, com o objetivo de entender como as células neoplásicas se comportam frente à presença ou ausência de infiltração capsular.

Diante da ausência de protocolos estabelecidos e publicados para quantificação da expressão das proteínas e fatores de transcrição ligados a TEM nas neoplasias da tireoide realizamos a estimativa em um campo de grande aumento (400x microscópio *Nikon Eclipse E200*) da porcentagem de expressão de cada um dos anticorpos em intervalos de 10% (totalizando 11 classes de 0 a 100%) nas células neoplásicas. Para isso selecionamos a região de melhor marcação (*hot spot*) no centro do tumor, na região periférica próxima à cápsula e na região de infiltração da cápsula, quando presente (Figura 5).

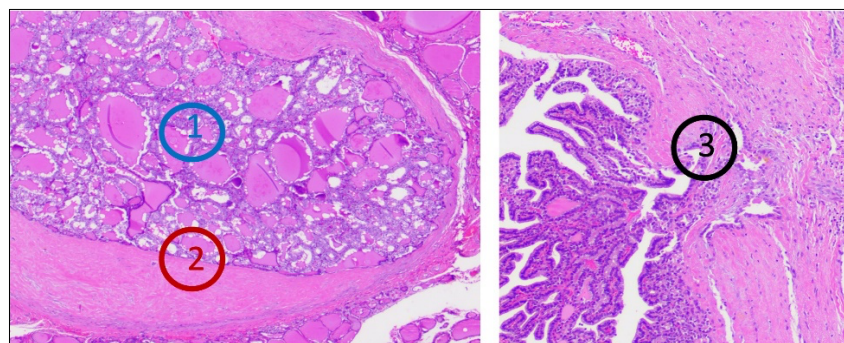


Figura 5 - Detalhamento da quantificação da expressão dos anticorpos relacionados a TEM. Realizada a estimativa em um campo de grande aumento, em intervalos de 10%, da melhor área de marcação (*hot spot*) no centro do tumor (Área 1), na periferia junto à cápsula (Área 2) e no fronte de invasão da cápsula (Área 3), quando houver.

Para E-caderina e β -catenina a marcação em membrana nas células neoplásicas epiteliais foi semiquantificada nas três regiões. Avaliamos também se estavam presentes ou ausentes as marcações citoplasmática e nuclear da β -catenina nas três regiões.

Para a Vimentina o padrão de marcação citoplasmático basal (subnuclear) (“padrão epitelial”) foi analisado nas células neoplásicas epiteliais de modo semiquantitativo nas três regiões. Classificamos também como presente ou ausente o padrão de marcação citoplasmático difuso (“padrão mesenquimal”) nas três regiões.

Para ZEB-1 e 2 realizamos a semiquantificação da marcação nuclear nas células epiteliais e estromais tumorais, separadamente, nas três regiões.

3.3.2.2 *BRAF*^{V600E}

A avaliação imuno-histoquímica para expressão da proteína com mutação *BRAF*^{V600E} foi considerada positiva quando identificada qualquer marcação citoplasmática granular e com intensidade forte nas células neoplásicas (61).. Os tumores foram considerados negativos para mutação quando não apresentaram marcação das células tumorais, se apenas marcação nuclear isolada ou de histiócitos. As reações que apresentaram marcação focal e com intensidade fraca foram consideradas duvidosas e submetidas a nova reação para contraprova.

3.3.2.3 *NRAS*^{Q61R}

A avaliação imuno-histoquímica para expressão da proteína com mutação *NRAS*^{Q61R} foi considerada positiva quando identificada qualquer marcação citoplasmática granular e com intensidade forte nas células neopl[ásicas (106). As reações que apresentaram marcação focal e com intensidade fraca foram consideradas duvidosas e submetidas a nova reação para contraprova.

3.4 Testes moleculares

As técnicas moleculares utilizadas para estudo das neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero foram realizadas no Laboratório As Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, sob supervisão do pós-graduando Gabriel A. C. Gama e orientação da Profa. Dra. Janete Maria Cerutti.

Dos 103 casos selecionados neste estudo, 81 foram submetidos a sequenciamento genético para pesquisa de mutação dos genes *BRAF* e *NRAS*. Devido à dificuldade de extração de DNA nos tumores muito pequenos, foram excluídos os nódulos menores que 4,0 mm (14 casos), aqueles com componente cístico exuberante (2 casos), os muito calcificados (2 casos) e os com bloco de parafina gasto (4 casos). Foram selecionados então 32 nódulos menores ou iguais a 10,0 mm e todos os maiores de 10,0 mm (49 casos) (Figura 6).

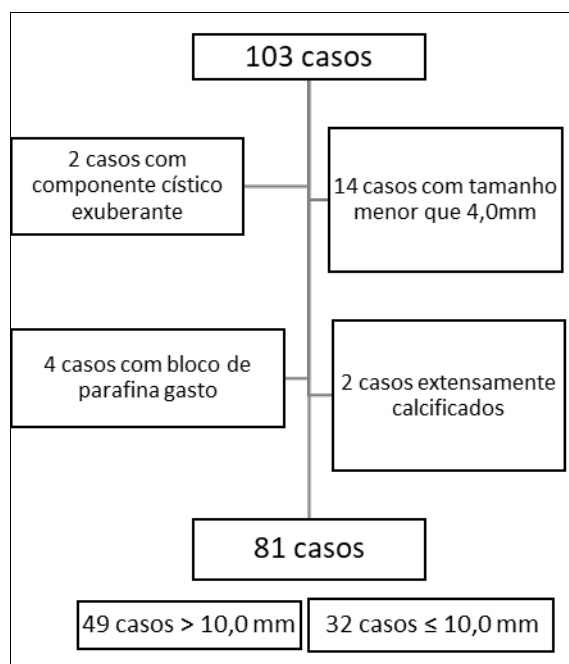


Figura 6 - Fluxograma dos casos sequenciados

3.4.1 Extração de DNA

3.4.1.1 Obtenção do tecido parafinado

Inicialmente foram realizados cortes em micrótomo dos blocos de parafina, sendo utilizada uma navalha por caso para evitar contaminação entre os tumores.

Para as neoplasias maiores que 10,0 mm e que ocupassem pelo menos 70% da área do tecido representado (36 casos), foram realizados 3 cortes de cada bloco com espessura de 10 μm , armazenados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (3 tubos com 3 cortes para cada caso) e mantidos em *Freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nos outros 45 casos, os cortes do bloco de parafina foram realizados com espessura de 8 μm e fixados em lâminas de microscopia simples (não silanizadas) para posterior macrodissecção. Foram feitos 1 ou 2 cortes por lâmina, numa média de 6 a 7 lâminas para cada caso, dependendo do tamanho do nódulo.

Para macrodissecção, identificamos com caneta marcadora os nódulos em cada corte do bloco de parafina fixado nas lâminas. Posteriormente extraímos o tecido por meio de raspagem com lâmina bisturi estéril (utilizada uma lâmina de bisturi por caso). O material foi armazenado em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml e mantidos em *Freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa técnica maximiza a obtenção de células neoplásicas em detrimento das células do parênquima tireoidiano normal naqueles tumores que perfaziam menos de 70% da área tecidual amostrada no bloco (Figuras 7 e 8).



Figura 7 - Macrodissecção: Identificação da área de interesse no corte do bloco de parafina com caneta marcadora

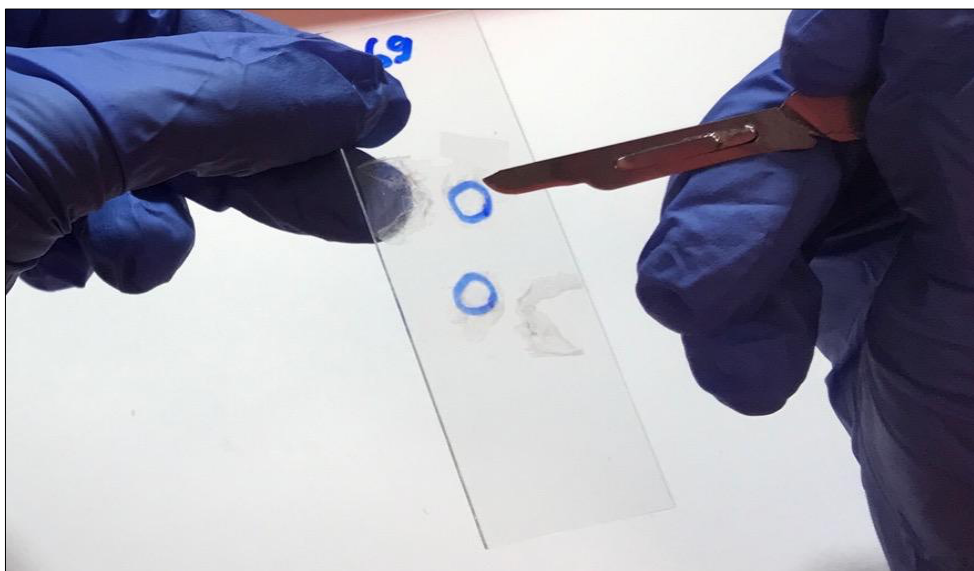


Figura 8 - Macrodissecção: Extração do tecido por meio de raspagem com lâmina bisturi estéril

3.4.1.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA do material fixado em parafina utilizamos o *kit QIAAmp[®] DNA FFPE Tissue* da marca QIAGEN e seguimos as orientações do fabricante. Este procedimento foi realizado em dois dias como detalhado a seguir.

Inicialmente realizamos o processo de desparafinização do tecido. Para tal adicionamos xilol (marca *Sigma*) nos tubos contendo o tecido parafinado, com posterior incubação em termobloco por 15 min a 56 °C a 500 rpm, seguido de

centrifugação por 3 minutos a 20000 G de velocidade. Ao final, o sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta. Essas etapas foram repetidas 3 vezes. Na sequência adicionamos Etanol absoluto (marca Merck) e centrifugamos por 3 minutos a 20000 G de velocidade, com posterior descarte do sobrenadante com auxílio de uma pipeta. Essas etapas foram repetidas 2 vezes e então os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente (37 °C) por 30 minutos para que o etanol remanescente evaporasse. Feito isso, adicionamos 180 µl da solução tampão ATL e 20 µl de proteinase K (*KIT QIAAamp® DNA FFPE Tissue*) nos tubos e incubamos a 56 °C por 12 horas.

No dia seguinte, incubamos o material a 90 °C por mais 1 hora. Após, centrifugamos brevemente (*short spin*) e adicionamos 2 µl de RNase. Depois de 2 minutos adicionamos 200 µl da solução tampão AL (*KIT QIAAamp® DNA FFPE Tissue*) e 200 µl de etanol (96 – 100%), centrifugamos brevemente (*short spin*). Transferimos então o material lisado para a coluna *QIAamp MinElute* e a conectamos a um tubo coletor estéril, centrifugamos a 6000 G por 1 min. Trocamos o tubo coletor por um novo, adicionamos 500 µl da solução tampão AW1 (*KIT QIAAamp® DNA FFPE Tissue*) na coluna e centrifugamos a 6000 G por 1 min. Trocamos novamente o tubo coletor por um novo, adicionamos 500 µl da solução tampão AW2 (*KIT QIAAamp® DNA FFPE Tissue*) na coluna e centrifugamos a 6000 G por 1 min. Trocamos mais uma vez o tubo coletor e centrifugamos a coluna a 20000 G por 3 minutos. Desprezamos o tubo coletor e posicionamos a coluna em um tubo de microcentrifugação de 1,5 ml. Adicionamos 50 µl de solução tampão ATE (*KIT QIAAamp® DNA FFPE Tissue*) e centrifugamos a 20000 G por 1 minuto. O material depositado do tubo de microcentrifugação proveniente da coluna contém o DNA extraído do tecido.

A qualidade da extração do DNA foi avaliada por espectrofotometria pelo aparelho *Nanodrop™ 2000/Thermo Fisher Scientific* e o exemplo de curva obtida encontra-se na Figura 9. A concentração ideal de DNA estabelecida foi de 50ng/µl, os casos com concentração maior foram diluídos com a solução tampão ATE para se aproximar ao máximo desta concentração ideal. Apenas 10 amostras apresentaram concentração abaixo de 20 ng/µl. O produto da extração foi então armazenado em Freezer a -20 °C.

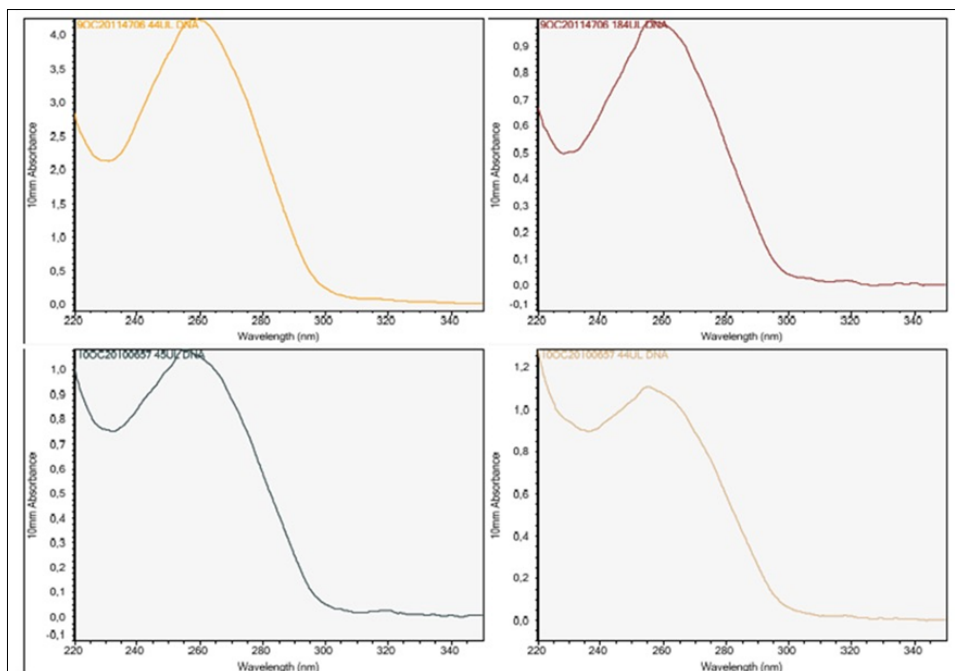


Figura 9 - Exemplo de curvas na espectrofotometria mostrando boa qualidade da extração de DNA

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O PCR é uma técnica molecular utilizada para amplificar qualquer sequência nucleotídica de forma seletiva. Iniciadores conhecidos sintetizados quimicamente são utilizados para demarcar a região do DNA a ser amplificada. Um ciclo de reação de PCR tem três etapas básicas: primeiro a amostra de DNA é aquecida para que a dupla fita seja separada, então a amostra é resfriada para que iniciadores específicos hibridizem com as sequências complementares nas duas fitas de DNA (5' e 3') e posteriormente a DNA-polimerase sintetiza a nova fita de DNA utilizando os quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados (108).

Realizamos a reação de PCR para amplificar as sequências dos genes *BRAF* e *NRAS*. Para isso utilizamos iniciadores conhecidos para cada um desses genes (Tabela 3).

Para a realização da reação, confeccionamos uma solução contendo os seguintes reagentes: 10X PCR *buffer* (tampão), Cloreto de magnésio ($MgCl_2$), iniciador 5' ou *forward*, iniciador 3' ou *reverse*, os quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), polimerase (TAQ), água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC - livre de RNases, DNases e resíduos de proteína) e a amostra de DNA, para um volume total de 50 μ l. Para a amplificação da

sequência de *NRAS*, além dos reagentes anteriormente pontuados, acrescentamos DMSO 2% (potenciador que aumenta o rendimento e a especificidade do PCR). Os preparados foram confeccionados em capela com filtro, previamente submetida a luz ultravioleta por 15 minutos.

Os volumes e concentrações de cada reagente estão especificadas nas Tabelas 4 e 5. Nos casos em que a concentração de DNA era baixa, o volume de DNA foi maior que 0,5 µl, com alteração proporcional dos demais reagentes. A reação de PCR para cada gene foi feita a cada 10 casos para evitar contaminação. Em todas as reações confeccionamos um controle negativo (NTC) que consiste em uma amostra apenas com a solução contendo os reagentes (sem adição de DNA).

Tabela 3 - Iniciadores (primers) utilizados para amplificação dos genes *NRAS* e *BRAF*

Gene/Mutação	Sequência
<i>NRAS</i> ^{A182G}	PF: 5' CAC CCC CAG GAT TCT TAC AG 3'
	PR: 5' TCG CCT GTC CTC ATG TAT TG 3'
<i>BRAF</i> ^{T1799A}	PF: 5' TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA 3'
	PR: 5' CCT CAA TTC TTA CCA TCC ACA AAA 3'

PF = Primer Forward e PR = Primer Reverse

Tabela 4 - Solução para PCR gene *BRAF*

Reagentes	Volume para 1 amostra (µl)
DNA	0,5 (~50ng)
10X PCR Buffer (tampão)	5 (1x)
MgCl ₂	1,5 (1,5mM)
PR	1 (0,2mM)
PF	1 (0,2mM)
dNTP	1 (0,8mM)
TAQ	0,4 (4U)
H ₂ O	39,6
Volume total	50

Tabela 5 - Solução para PCR gene *NRAS*

Reagentes	Volume para 1 amostra (µl)
DNA	0,5 (~50 ng)
Tampão	5 (1x)
MgCl ₂	1,5 (1,5 mM)
PR	1 (0,2 mM)
PF	1 (0,2 mM)
dNTP	1 (0,8 mM)
TAQ	0,4 (4 U)
DMSO	1 (2%)
H ₂ O	38,6
Volume total	50

A reação de PCR foi realizada no termociclador utilizando protocolos específicos e elaborados no próprio Laboratório Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP para cada um dos genes estudados (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Protocolo para realização de amplificação do gene *BRAF*, com detalhamento da temperatura, tempo (minutos ou segundos) e número de ciclos realizados

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94 °C	5 minutos	1
94 °C	30 segundos	40
53 °C	40 segundos	40
72 °C	30 segundos	40
72 °C	7 minutos	1

Tabela 7 - Protocolo para realização de amplificação do gene *NRAS*, com detalhamento da temperatura, tempo (minutos ou segundos) e número de ciclos realizados

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94 °C	5 minutos	1
94 °C	30 segundos	40
56 °C	45 segundos	40
72 °C	45 segundos	40
72 °C	7 minutos	1

Após termociclagem, realizamos a eletroforese em gel de agarose (*Sigma*) de cada produto de PCR para confirmar a amplificação da sequência de DNA de interesse. O gel foi preparado com 0,5 g de agarose (concentração final de 2%) diluída em 55 ml de tampão TAE e 1 µl de Aliquota de *Gel Red* (corante

para posterior leitura do gel). Em cada poço do gel adicionamos 5 μ l do produto de PCR de cada caso e 1 μ l de *Orange G* (corante para visualização da banda a olho nu). No primeiro poço colocamos um marcador de peso molecular conhecido (*DNA Ladder* para 50 pb) e no último poço colocamos o controle negativo (NTC) da reação. A eletroforese foi realizada na cuba *Mini-Sub*[®] *Bio-Rad*, com corrente a 110 Volts por 15 minutos (Figuras 10 e 11). Obtivemos produto de PCR de todos os 81 casos para ambos os genes estudados.

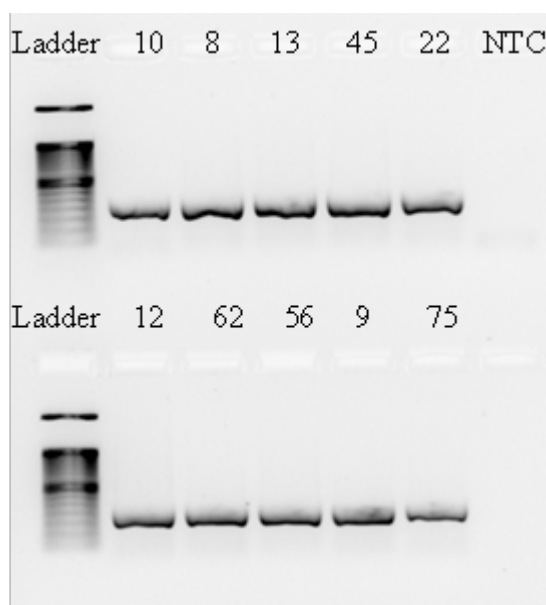


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da amplificação do gene *BRAF* (tamanho do produto: 195 pb)

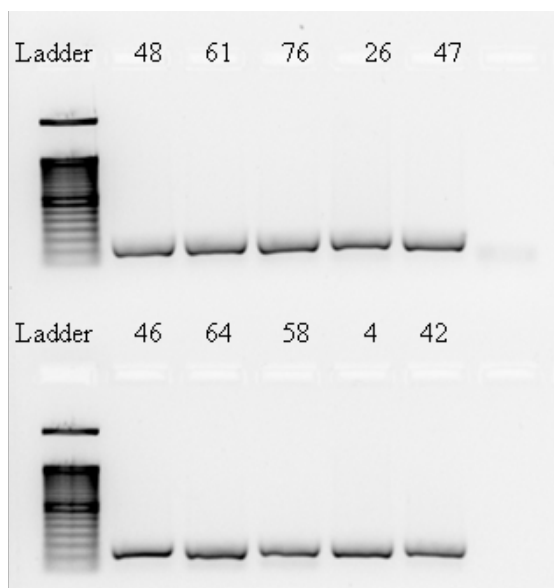


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da amplificação do gene *NRAS* (tamanho do produto: 123 pb)

3.4.3 Sequenciamento de DNA extraído das amostras (método de Sanger)

Para a busca das mutações *BRAF*^{T1799A} (p. V600E) e *NRAS*^{A182G} (p. Q61R) os produtos de PCR foram purificados utilizando *ExoSap Purification Kit* (Ge Healthcare, Buckinghamshire, UK). Para tal, 1 µl de *Exosap* foi adicionado a uma alíquota de PCR (volume entre 5 a 9 µl, dependendo da amostra), submetido a termociclagem por 15 minutos a 37 °C e posteriormente mais 15 minutos a 80 °C.

As reações de sequenciamento foram realizadas com *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para tal, para uma alíquota do produto de PCR (de 5 a 9 µl) foi adicionado 14 µl de solução de reação de sequenciamento contendo tampão (0,2 M Tris-HCl (pH 9,0), 0,1 mM MgCl₂), *BigDye*, Água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC - livre de RNAses, DNAses e resíduos de proteína) e iniciador 5' ou *forward* (para genes *NRAS* e *BRAF*) (Tabela 8).

As condições da reação de sequenciamento foram: 96 °C por 2 minutos uma vez, 27 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos. As reações foram precipitadas segundo protocolo do fabricante, denaturadas por 2 minutos à 95 °C em 10 µL de Formamida HiDi (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e então colocadas em gelo durante cinco minutos. A eletroforese capilar e detecção das fluorescências foram realizadas no aparelho *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*).

A análise dos eletroesferogramas foi realizada com o *software Sequence Scanner v1.0* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) ou *Snap Gene Viewer v3.2* (*GSL Biotech LLC, Chicago, IL, EUA*). As amostras em que o resultado do sequenciamento não foi satisfatório foram re-amplificadas e resequenciadas como descrito anteriormente.

Tabela 8 - Solução para sequenciamento

Reagentes	Volume para 1 amostra (μ l)
Tampão	3,5
<i>Big Dye</i>	1
PF	0,32 (0,064 mM)
H ₂ O	9,18
Volume total	14 μ l

3.5 Análise estatística

Para desenvolver os objetivos desse estudo uma série de análises estatísticas foi realizada utilizando o programa R versão 3.4.3 (2017) e o programa SPSS versão 23.

Análise exploratória do conjunto de dados, com contagens e porcentagens das variáveis qualitativas e cálculo de médias, medianas e desvios padrão das variáveis quantitativas, demonstrou a distribuição de variáveis clínicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas.

Testes Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher (quando pelo menos uma frequência esperada foi menor que 5) foram realizados para verificar a associação entre as variáveis clínicas e anatomopatológicas quando categóricas.

Teste T para amostra independentes nas tabelas 2x2 (com cálculo das variâncias pelo teste F) e Testes ANOVA unifatorial ou Kruskal-Wallis nas tabelas 3x2 (com adicional testes de normalidade de Shapiro-Wilk e testes de variância de Barlett) foram realizados para verificar a associação entre as variáveis clínicas e anatomopatológicas quando numéricas.

Modelo de Regressão Logística foi realizado para verificar quais as variáveis anatomopatológicas melhor se relacionaram com a infiltração da cápsula.

Testes de Wilcoxon para amostras pareadas foram realizados para comparar a expressão entre os marcadores imuno-histoquímicos ligados a TEM nas três regiões tumorais estudadas (região central, região periférica e no fronte de infiltração tumoral da cápsula fibrosa).

Em todas as análises estatísticas realizadas foi utilizado um nível de significância de 5% (p -valor $\leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis clínicas e anatomopatológicas

Nesta série de 103 casos, cujo detalhamento encontra-se na Tabela 9 e nas Figuras 12, 13 e 14, 68,0% dos pacientes eram do sexo feminino e a média das idades foi de 41,8 anos, sendo de 40,8 anos para as mulheres e 44,0 anos para os homens.

A cirurgia mais frequente foi tireoidectomia total (94,2%), com leve predomínio da neoplasia no lobo direito (52,4%). O tamanho médio dos nódulos foi de 12,4 mm, com mediana de 8,0 mm, sendo o maior nódulo medindo 55,0 mm e o menor 1,0 mm. As neoplasias foram divididas em dois grupos de acordo com o tamanho do nódulo, sendo 49 tumores maiores de 10,0 mm e 54 tumores menores ou iguais a 10,0 mm. Este valor de corte foi baseado na classificação de microcarcinoma papilífero estabelecido pela OMS (109).

Os nódulos apresentaram cápsula com espessura média de 0,59 mm, sendo que a mais delgada apresentou espessura de 0,06 mm e a mais espessa de 2,45 mm. A infiltração da cápsula foi observada em 67,0% dos casos, sendo predominante a infiltração intracapsular (59,4%).

Quanto ao padrão arquitetural da neoplasia, 28 casos (27,2%) apresentaram arquitetura puramente folicular. Dentre estes, 13 casos (46%) revelaram infiltração da cápsula tumoral, dos quais 4 apresentaram invasão vascular concomitante. Estes então puderam ser classificados como carcinomas papilíferos variante folicular encapsulado invasivo. Os 15 casos restantes não apresentaram invasão capsular ou vascular, sendo classificados como NIFTP (8 maiores que 10,0 mm e 7 menores ou iguais a 10,0 mm).

Alguma formação de papila foi observada em 75 casos (72,8%), sendo classificadas como Carcinoma papilífero subtipo clássico encapsulado. Dentre eles, 29 neoplasias apresentaram arquitetura puramente papilífera, das quais 25 casos (86%) exibiram infiltração da cápsula tumoral e um deles mostrou invasão vascular concomitante. Os 4 casos restantes mostraram cápsula tumoral íntegra e sem invasão vascular.

Dentre os 46 nódulos de padrão misto (formação de papilas e de folículos), 31 (67%) apresentaram infiltração da cápsula tumoral, dos quais 3 apresentaram invasão vascular concomitante (sendo dois casos com formação

de 10% de papilas e um com formação de 60% de papilas). Os outros 15 casos não evidenciaram infiltração da cápsula ou invasão vascular.

Invasão vascular foi observada em 8 casos, todos apresentando infiltração da cápsula. Sete casos (87,5%) eram maiores de 10,0 mm. Em relação ao padrão arquitetural, 4 casos tinham padrão puramente folicular e apresentaram apenas invasão vascular venosa; 2 casos apresentaram formação de 10% de papilas e apenas invasão vascular venosa; 1 apresentou formação de 60% de papilas e apenas invasão vascular linfática e 1 era puramente papilar e apresentou tanto invasão vascular linfática e quanto venosa. A diferenciação entre invasão neoplásica vascular linfática e venosa foi feita com auxílio do exame imuno-histoquímico para D2-40.

Fibrose intratumoral esteve presente em 44,7% das neoplasias e inflamação foi observada em apenas 5 dos casos (4,9%).

Extensão extratireoidiana foi identificada em apenas 4 casos (3,9%), todos eles com infiltração da cápsula, sendo 2 com 60% de formação de papilas (um deles com invasão vascular e metástase linfonodal concomitantes) e 2 puramente papilares.

Em 55 dos casos (53,4% da casuística) foi feita a avaliação de linfonodos regionais (principalmente de nível VI), sendo diagnosticada metástase linfonodal em 11 casos (20,0%). No total foram avaliados 233 linfonodos, com presença de metástase em 22 deles. Todos os casos com metástase linfonodal apresentaram infiltração da cápsula, sendo que 1 caso apresentou invasão vascular e extensão extratireoidiana concomitantes (60% de formação de papilas) e 2 exibiram apenas invasão vascular concomitante (um com 100% de formação de papilas e um com apenas formação de folículos, neste último a invasão capsular foi extensa). Dois eram menores ou iguais a 10,0 mm e 9 maiores de 10,0 mm. Os dois casos subcentimétricos apresentaram formação de papilas em 90% e 100% da neoplasia, sem invasão vascular identificada ou extensão extratireoidiana. Dos nove casos maiores que 10,0 mm com metástase linfonodal, 5 apresentaram 100% de formação de papilas, 3 apresentaram mais de 50% de formação de papilas (um caso com 60% de formação de papilas e dois com 90% de formação de papilas) e 1 apresentou apenas formação de folículos.

Dos 49 casos maiores de 10,0 mm, 34 foram totalmente incluídos para avaliação histológica. Dos casos parcialmente incluídos (15 casos), 4 apresentaram cápsula totalmente representada e 11 apresentaram infiltração da cápsula. Todas as neoplasias menores ou iguais a 10,0 mm foram integralmente incluídas para análise histológica.

Tabela 9 - Detalhamento da distribuição das variáveis clínico-patológicas

Variável	Número de casos	Porcentagem total
Sexo		
Feminino	70	68,0%
Masculino	33	32,0%
Total	103	100%
Idade (anos) (média = 41,8 anos; desvio padrão = 11,01 anos; mediana = 40,0 anos)		
Média das idades sexo feminino = 40,8 anos (desvio padrão = 11,25 anos; mediana= 40,0 anos)		
Média das idades sexo masculino = 44,0 anos (desvio padrão = 10,3 anos; mediana= 42,0 anos)		
Tipo de cirurgia realizada		
Lobectomia direita	1	1,0%
Lobectomia esquerda	0	0,0%
Tireoidectomia total	97	94,2%
Lobectomia direita e istmectomia	2	1,9%
Lobectomia esquerda e istmectomia	3	2,9%
Total	103	100%
Localização da neoplasia		
Lobo direito	54	52,4%
Lobo esquerdo	44	42,7%
Istmo	5	4,9%
Total	103	100%
Tamanho nódulo (média = 12,3 mm; desvio padrão = 10,1 mm; mediana = 8,0 mm; mínimo = 1,0 mm; máximo = 55,0 mm)		
≤10,0 mm	54	52,4%
>10,0 mm	49	47,6%
Total	103	100%
Espessura da cápsula (mm)		
Espessura média = 0,59 (desvio padrão = 0,44; mediana = 0,46 mm; mínimo = 0,06 mm e máximo:2,45 mm)		
Infiltração da cápsula		
Ausente	34	33,0%
Presente	69	67,0%
Total	103	100%

continua...

...continuação

Tabela 9 - Detalhamento da distribuição das variáveis clínico-patológicas

Tipo de infiltração capsular		
Intracapsular	41	59,4%
Intra e Transcapsular	28	40,6%
Total	69	100%
Padrão arquitetural		
0% papila	28	27,2%
10 a 50% papilas	23	22,3%
60 a 90% papilas	23	22,3%
100% papilas	29	28,2%
Total	103	100%
Fibrose intratumoral		
Ausente	57	55,3%
Presente	46	44,7%
Total	103	100%
Inflamação intratumoral		
Ausente	98	95,1%
Presente	5	4,9%
Total	103	100%
Invasão vascular		
Ausente	95	92,2%
Presente	8	7,8%
Total	103	100%
Extensão extratireoidiana		
Ausente	99	96,1%
Presente	4	3,9%
Total	103	100%
Metástase linfonodal*		
Ausente	44	80,0%
Presente	11	20,0%
Total	55	100%

*A avaliação linfonodal foi realizada em 55 dos 103 casos estudados

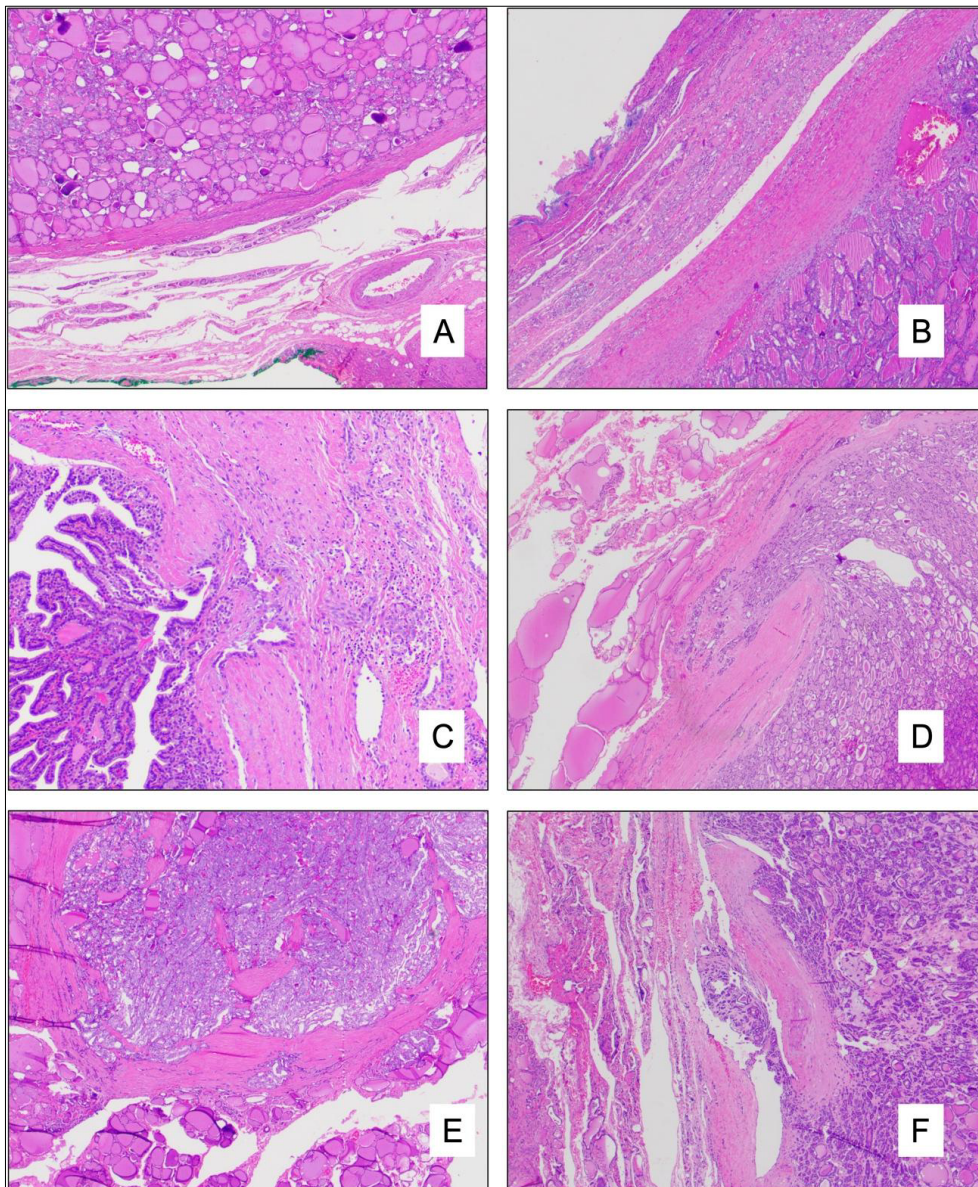


Figura 12 - Cápsula tumoral A: Cápsula tumoral delgada (espessura $\leq 0,5$ mm). B: Cápsula tumoral espessa (espessura $> 0,5$ mm). C: Infiltração neoplásica intracapsular. D e E: Infiltração neoplásica transcapsular. F: Foco de invasão vascular junto da cápsula. Aumento de 100x em A, B, D, E e F. Aumento de 200x em C

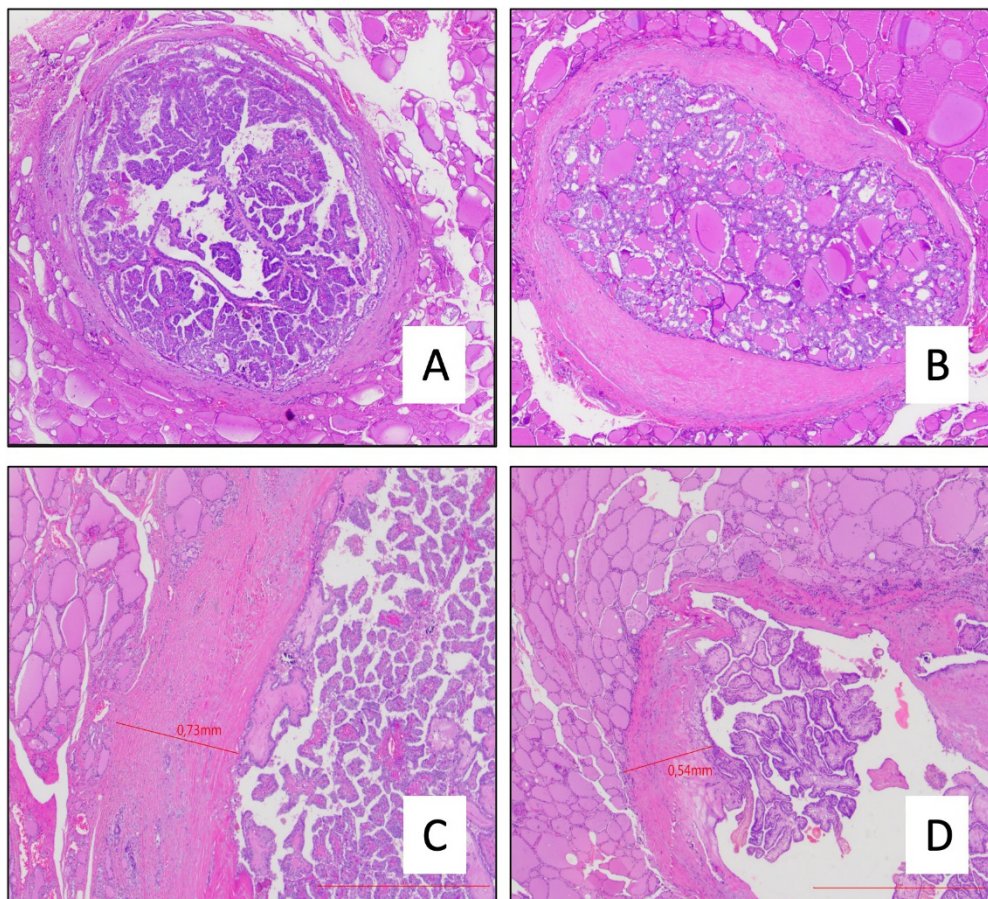


Figura 13 - Neoplasias menores ou iguais a 10,0 mm. A: Padrão arquitetural puramente papilar, com cápsula tumoral delgada e sem infiltração. B: Padrão arquitetural puramente folicular, com cápsula tumoral espessa e sem infiltração. C e D: Medida da espessura da cápsula. Foto panorâmica em A e B. Aumento de 100x em C. Aumento de 200x em D

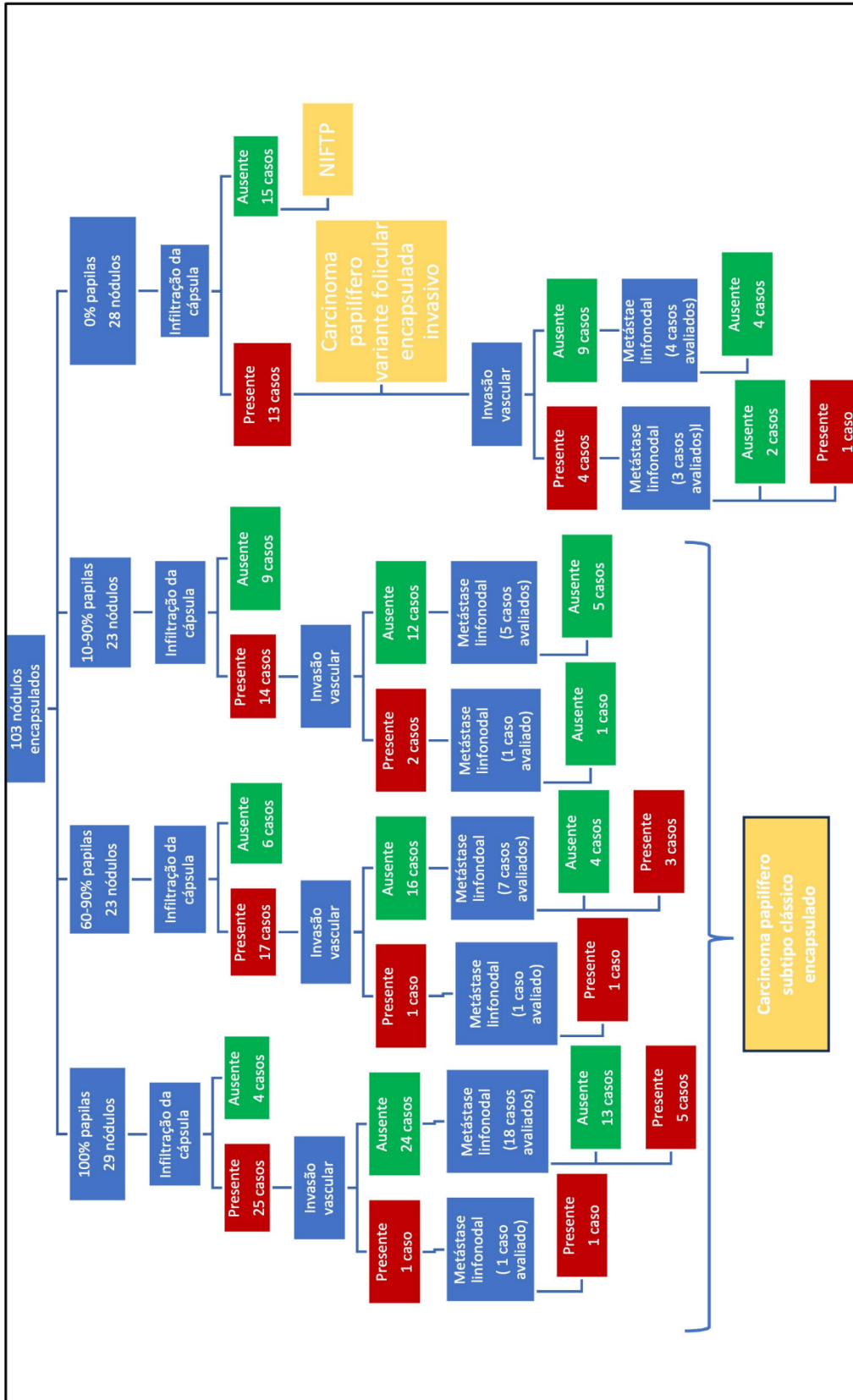


Figura 14 - Fluxograma dos 103 casos estudados levando em consideração as seguintes variáveis histológicas: padrão arquitetural, infiltração da cápsula, invasão vascular e metástase linfonodal

4.2 Associação entre padrão arquitetural da neoplasia e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas

O padrão arquitetural da neoplasia avaliado em quatro grupos (0% de papilas, 10 a 50% de papilas, 60 a 90% de papilas e 100% de papilas), apresentou associação estatística com infiltração da cápsula ($p=0,011$), fibrose intratumoral ($p=0,016$) e espessura da cápsula ($p=0,001$) (Tabela 10).

Observamos que os tumores com 100% de formação de papilas apresentaram maior frequência de infiltração da cápsula (Gráfico 1) e cápsula mais espessa (Gráfico 2). Já as neoplasias puramente foliculares apresentaram menor frequência de fibrose intratumoral (Gráfico 3).

As demais variáveis clínicas e anatomopatológicas não apresentaram associação estatística com o padrão arquitetural da neoplasia. Porém, observamos a ocorrência de apenas 1 caso de metástase linfonodal nos nódulos com até 50% de formação de papilas, comparados com 10 casos com metástase linfonodos nos nódulos com mais de 50% de formação de papilas ($p=0,136$). Por outro lado, houve uma maior frequência de invasão vascular nos casos puramente foliculares (4 casos).

Tabela 10 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o padrão arquitetural da neoplasia

Variáveis	0% papila	10-50% papila	60-90% papila	100% papila	Valor de p
Gênero					0,138 ^a
Feminino	19 (67,9%)	20 (87,0%)	14 (60,9%)	17 (58,6%)	
Masculino	9 (32,1%)	3 (13,0%)	9 (39,1%)	12 (41,4%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	
Média das idades (anos)	36,5	40,0	47,0	42,0	0,098 ^b
Localização					0,302 ^c
Lobo D	19 (67,9%)	10 (43,5%)	12 (52,2%)	13 (44,8%)	
Lobo E	8 (28,6%)	13 (56,5%)	10 (43,5%)	13 (44,8%)	
Istmo	1 (3,6%)	0	1 (4,3%)	3 (10,4%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	
Tamanho					0,307 ^a
≤ 10mm	11 (39,3%)	15 (65,2%)	13 (56,5%)	15 (51,7%)	
>10 mm	17 (60,7%)	8 (34,8%)	10 (43,5%)	14 (48,3%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	
Espessura da cápsula (mediana – mm)	0,40	0,32	0,56	0,78	0,001^b
Infiltração da cápsula					0,011^a
Ausente	15 (53,6%)	9 (39,1%)	6 (26,1)	4 (13,8%)	
Presente	13 (46,4%)	14 (60,9%)	17 (73,9%)	25 (86,2%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 10 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o padrão arquitetural da neoplasia

Variáveis	0% papila	10-50% papila	60-90% papila	100% papila	Valor de p
Fibrose intratumoral					0,016^a
Ausente	22 (78,6%)	13 (56,5%)	11 (47,8%)	11 (37,9%)	
Presente	6 (21,4%)	10 (43,5%)	12 (52,2%)	18 (62,1%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	
Inflamação intratumoral					>0,999
Ausente	27 (96,4%)	22 (95,7%)	22 (95,7%)	27 (93,1%)	
Presente	1 (3,6%)	1 (4,3%)	1 (4,3%)	2 (6,9%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	
Invasão vascular					0,470 ^c
Ausente	24 (85,7%)	21 (91,3%)	22 (95,1%)	28 (96,6%)	
Presente	4 (14,3%)	2 (8,7%)	1 (4,3%)	1 (3,4%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	
Extensão extratireoidiana					0,299 ^c
Ausente	28 (100%)	23 (100%)	21 (91,3%)	27 (93,1%)	
Presente	0	0	2 (8,7%)	2 (6,9%)	
Total	28 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	29 (100%)	
Metástase linfonodal*					0,136 ^c
Ausente	11 (91,7%)	10 (100%)	8 (66,7%)	15 (71,4%)	
Presente	1 (8,3%)	0	4 (33,3%)	6 (28,6%)	
Total	12 (100%)	10 (100%)	12 (100%)	21 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson^b Teste Kruskal-Wallis^c Teste Exato de Fisher

*Considerados os 55 casos com avaliação linfonodal para a análise estatística

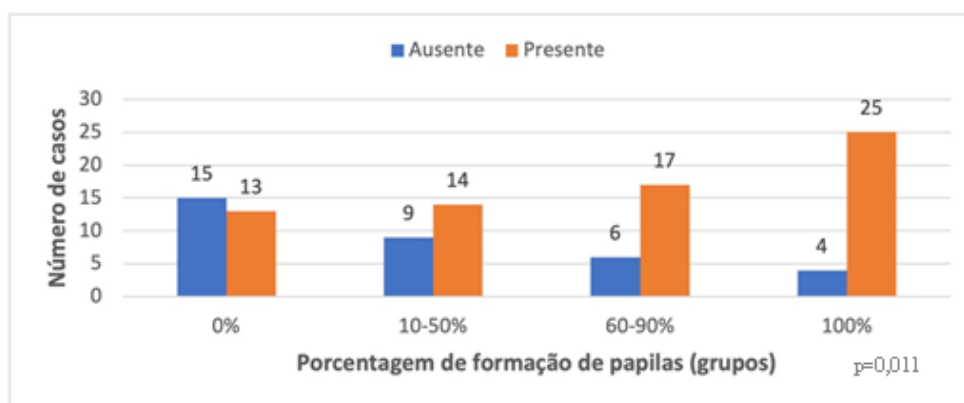
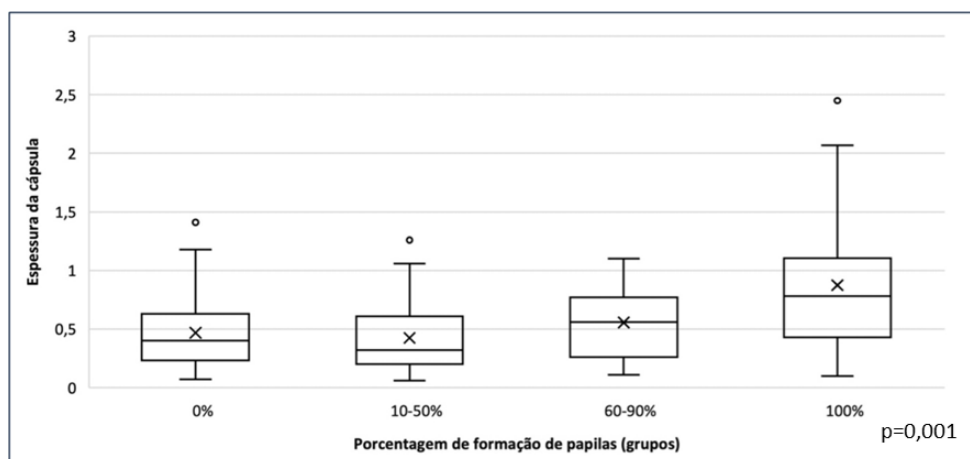
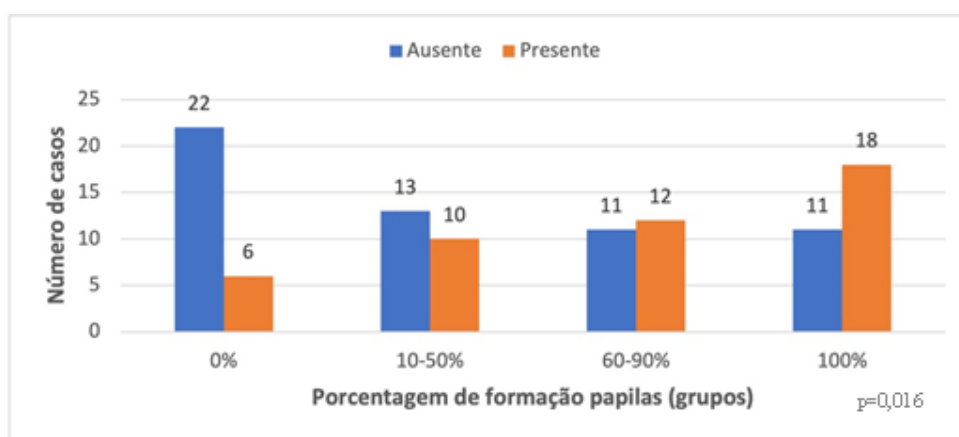
Gráfico 1 - Infiltração da cápsula por padrão arquitetural

Gráfico 2 - Espessura da cápsula por padrão arquitetural**Gráfico 3** - Fibrose intratumoral por padrão arquitetural

4.3 Associação entre infiltração da cápsula tumoral e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas

A análise genérica de qualquer infiltração de cápsula tumoral (Tabela 11) mostrou associação estatística com padrão arquitetural ($p=0,011$) (Gráfico 1, item 4.2), fibrose intratumoral ($p=0,009$), invasão vascular ($p=0,050$), metástase linfonodal ($p=0,024$) e espessura da cápsula ($p=0,007$).

Os tumores sem infiltração da cápsula mostraram maior frequência de padrão arquitetural puramente folicular (0% de papilas) e menor mediada de porcentagem de formação de papilas, não apresentaram invasão vascular (Gráfico 4) nem metástase linfonodal (Gráfico 5), apresentaram menor frequência de fibrose intratumoral (Gráfico 6) e cápsula com espessura mais delgada (Gráfico 7).

As demais variáveis clínicas e anatomopatológicas não apresentaram associação estatística com a infiltração da cápsula tumoral.

Tabela 11 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e infiltração da cápsula tumoral

Variáveis	Infiltração da cápsula tumoral		Valor de p
	Ausente	Presente	
Gênero			0,193 ^a
Feminino	26 (76,5%)	44 (63,8%)	
Masculino	8 (23,5%)	25 (36,2%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Média das idades (anos)	41,7	41,8	0,969 ^b
Localização			0,426 ^c
Lobo D	20 (58,8%)	34 (49,3%)	
Lobo E	14 (41,2%)	30 (43,5%)	
Istmo	0 (0%)	5 (7,2%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Tamanho			0,182 ^a
≤10mm	21 (61,8%)	33 (47,8%)	
>10mm	13 (38,2%)	36 (52,2%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,43	0,67	0,007^b
Padrão arquitetural (% de formação de papilas - mediana)	10	70	0,001^d
Padrão arquitetural			0,011^a
0% papila	15 (44,1%)	13 (18,8%)	
10-50% papila	9 (26,5%)	14 (20,3%)	
60-90% papila	6 (17,6%)	17 (24,4%)	
100% papila	4 (11,8%)	25 (36,2%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,009^a
Ausente	25 (73,5%)	32 (46,4%)	
Presente	9 (26,5%)	37 (53,6%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Inflamação intratumoral			>0,999 ^c
Ausente	33 (97,1%)	65 (94,2%)	
Presente	1 (2,9%)	4 (5,8%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Invasão vascular			0,050^c
Ausente	34 (100%)	61 (88,4%)	
Presente	0	8 (11,6%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,299 ^c
Ausente	34 (100%)	65 (94,2%)	
Presente	0	4 (5,8%)	
Total	34 (100%)	69 (100%)	
Metástase linfonodal*			0,024^c
Ausente	15 (100%)	29 (72,5%)	
Presente	0	11 (27,5%)	
Total	15 (100%)	40 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

^d Teste de Wilcoxon para duas amostras

*Considerados os 55 casos com avaliação linfonodal para a análise estatística

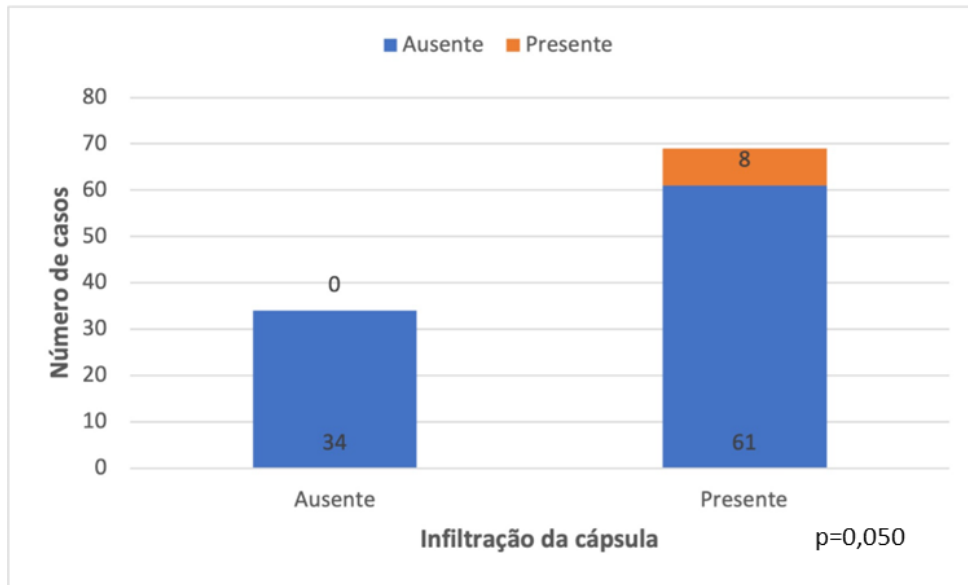
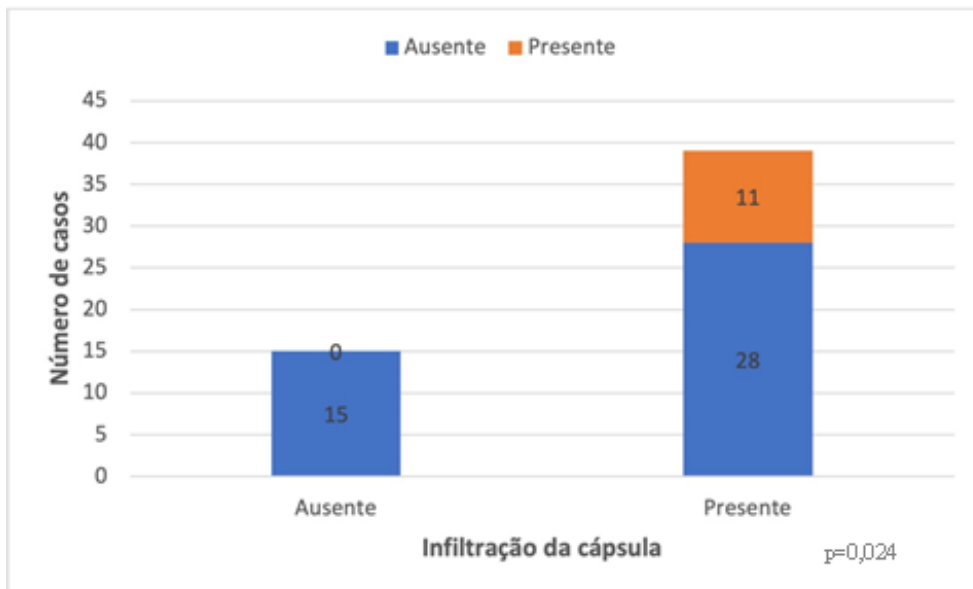
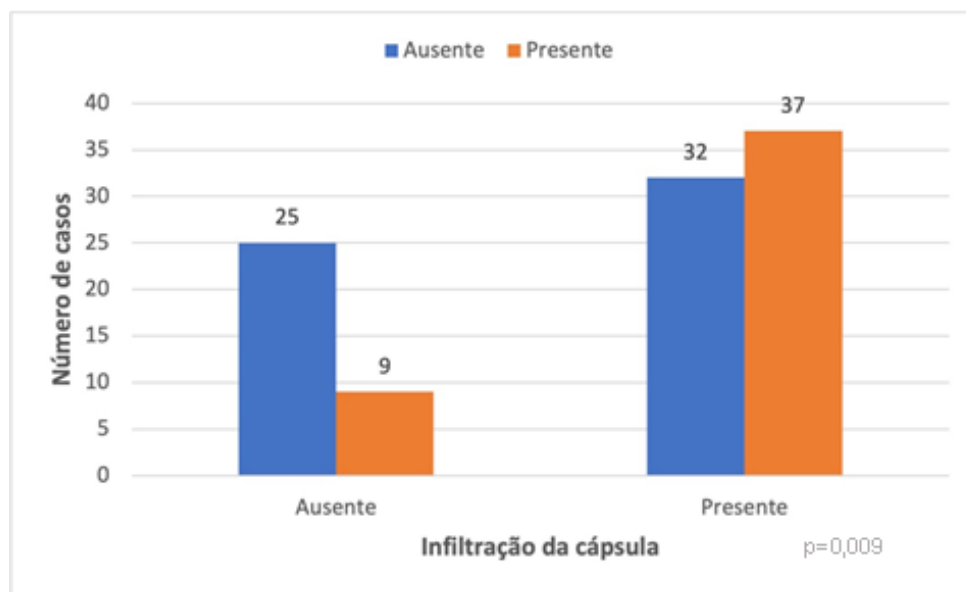
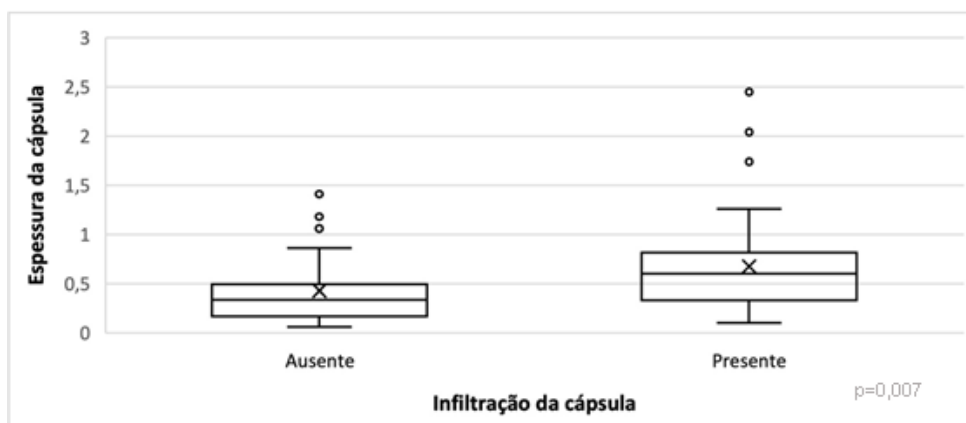
Gráfico 4 - Invasão vascular por infiltração da cápsula tumoral**Gráfico 5** - Metástase linfonodal por infiltração da cápsula tumoral

Gráfico 6 - Fibrose intratumoral por infiltração da cápsula tumoral**Gráfico 7** - Espessura da cápsula por infiltração da cápsula tumoral

4.3.1 Associação entre o tipo de infiltração da cápsula tumoral e as demais variáveis anatomopatológicas

Quando analisamos a associação do tipo de infiltração da cápsula (intracapsular ou transcapsular) com espessura da cápsula, padrão arquitetural da neoplasia, fibrose intratumoral, invasão vascular e metástase linfonodal não encontramos associações estatisticamente significantes (Tabela 12).

Tabela 12 - Associação entre as variáveis anatomopatológicas e o tipo de infiltração da cápsula tumoral (69 casos com infiltração da cápsula)

Variáveis	Tipo de infiltração capsular		Valor de p
	Intra-capsular	Transcapsular	
Espessura da cápsula (mm)	0,75	0,55	0,083 ^a
Padrão arquitetural			0,288 ^b
0% papila	10 (24,4%)	3 (10,7%)	
10-50% papila	6 (14,6%)	8 (28,6%)	
60-90% papila	9 (22,0%)	8 (28,6%)	
100% papila	16 (39,0%)	9 (32,1%)	
Total	41 (100%)	28 (100%)	
Fibrose tumoral			0,142 ^b
Ausente	22 (53,7%)	10 (35,7%)	
Presente	19 (46,3%)	18 (64,3%)	
Total	41 (100%)	28 (100%)	
Invasão vascular			>0,999 ^c
Ausente	36 (87,8%)	25 (89,3%)	
Presente	5 (12,2%)	3 (10,7%)	
Total	41 (100%)	28 (100%)	
Metástase linfonodal*			0,729 ^c
Ausente	16 (69,6%)	13 (76,5%)	
Presente	7 (30,4%)	4 (23,5%)	
Total	23 (100%)	17 (100%)	

^a Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^b Teste Qui-quadrado de Pearson

^c Teste Exato de Fisher

* Considerados apenas os 40 casos com avaliação linfonodal

4.3.2 Avaliação da relação entre a ocorrência de infiltração capsular e cada variável anatomopatológica

A análise da relação de cada variável anatomopatológica com a infiltração da cápsula (Tabela 13) mostrou que apenas padrão arquitetural, espessura da cápsula e fibrose intratumoral tiveram alguma influência na ocorrência da infiltração.

Os tumores com 100% de formação de papilas apresentaram 7,21 vezes mais chance de ter infiltração da cápsula do que tumores com 0% de papila. A razão de chance de infiltração da cápsula não foi significativa entre os grupos com 10-50% e 60-90% de formação de papila e o grupo com 0% de formação de papila, porém observamos uma tendência de os tumores com mais de 50% de formação de papilas ter mais chance de infiltrar ($p=0,051$).

Os tumores com fibrose intratumoral apresentaram 3,21 vezes mais chance de ter infiltração da cápsula do que os sem fibrose.

Em relação à espessura da cápsula, a chance de infiltração da cápsula aumentou a cada acréscimo na unidade de medida da espessura.

Tabela 13 – Avaliação da relação entre cada variável anatomopatológica e a ocorrência de infiltração capsular

Fator	Estimativa	p-valor	OR	IC de 95%
Espessura	1,81	0,0114	6,11	[1,5; 24,78]
Fibrose intratumoral (presente vs ausente)	1,17	0,0108	3,21	[1,31; 7,87]
Invasão linfovascular (presente vs ausente)	2,26	0,9988	9,54	[0,53; 170,32]
Metastase linfonodal (presente vs ausente)	2,49	0,9986	12,08	[0,67; 219,07]
Porcentagem papila (10%-50% papila vs 0% papila)	0,58	0,3057	1,79	[0,59; 5,5]
Porcentagem papila (60%-90% papila vs 0% papila)	1,18	0,0512	3,27	[0,99; 10,75]
Porcentagem papila (100% papila vs 0% papila)	1,98	0,0027	7,21	[1,98; 26,21]

4.4 Associação entre o tamanho da neoplasia e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas

Nesta série de casos, o tamanho da neoplasia teve associação estatística com invasão vascular ($p=0,024$), metástase linfonodal ($p=0,010$) e espessura da cápsula ($p=0,008^2$) (Tabela 14).

Observamos que os tumores menores ($\leq 10,0$ mm) apresentaram menor frequência de invasão vascular (Gráfico 8), menor frequência de metástase linfonodal (Gráfico 9) e cápsula mais delgada (Gráfico 10).

As demais variáveis clínicas e anatomopatológicas não apresentaram associação estatística com o tamanho da neoplasia.

Tabela 14 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e tamanho do nódulo neoplásico

Variáveis	Tamanho do nódulo		p-valor
	$\leq 10,0$ mm	$> 10,0$ mm	
Gênero			0,330 ^a
Feminino	39 (72,2%)	31 (63,3%)	
Masculino	15 (27,8%)	18 (36,7%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	
Média das idades (anos)	42,4	41,1	0,528 ^b
Localização			0,316 ^c
Lobo D	26 (48,2%)	28 (57,1%)	
Lobo E	26 (48,1%)	18 (36,7%)	
Istmo	2 (3,7%)	3 (6,1%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,40	0,79	0,001^{-2b}
Padrão arquitetural			0,307 ^a
0% papila	11 (20,4%)	17 (34,7%)	
10-50% papila	15 (27,8%)	8 (16,3%)	
60-90% papila	13 (24,1%)	10 (20,4)	
100% papila	15 (27,8%)	14 (28,6%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 14 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e tamanho do nódulo neoplásico

Variáveis	Tamanho do nódulo		Valor de p
	≤ 10,0 mm	> 10,0 mm	
Infiltração da cápsula			0,182 ^a
Ausente	21 (38,9%)	13 (26,5%)	
Presente	33 (61,1%)	36 (73,5%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,725 ^a
Ausente	29 (53,7%)	28 (57,1%)	
Presente	25 (46,3%)	21 (42,9%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	
Inflamação intratumoral			0,365 ^c
Ausente	50 (92,6%)	48 (98,0%)	
Presente	4 (7,4%)	1 (2,0%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	
Invasão vascular			0,025^c
Ausente	53 (98,1%)	42 (85,7%)	
Presente	1 (1,9%)	7 (14,3%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,344 ^c
Ausente	53 (98,1%)	46 (93,9%)	
Presente	1 (1,9%)	3 (6,1%)	
Total	54 (100%)	49 (100%)	
Metástase linfonodal*			0,010^a
Ausente	27 (93,1%)	17 (65,4%)	
Presente	2 (6,9%)	9 (34,6%)	
Total	29 (100%)	26 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)^c Teste Exato de Fisher

* Considerados os 55 casos com avaliação linfonodal para a análise estatística

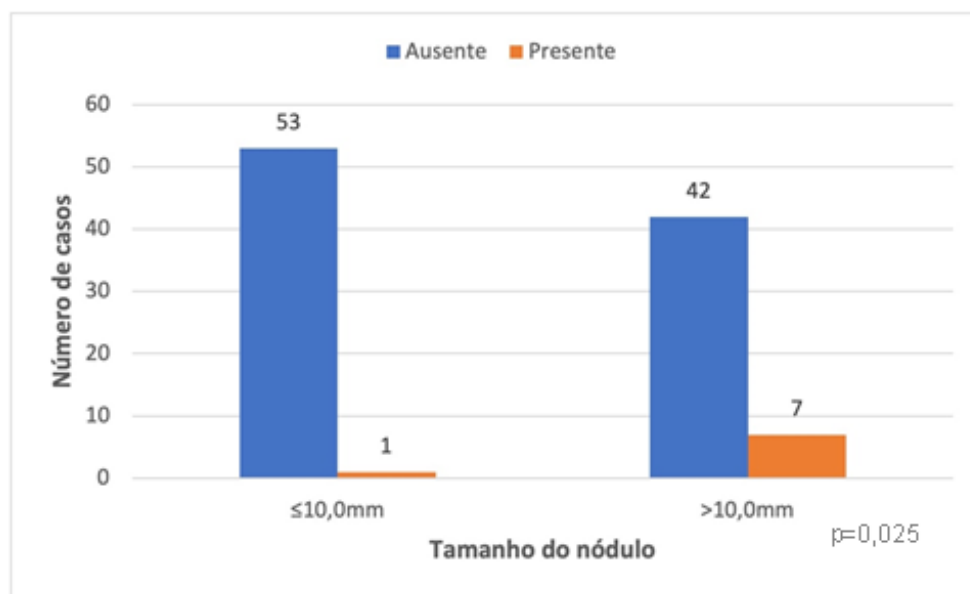
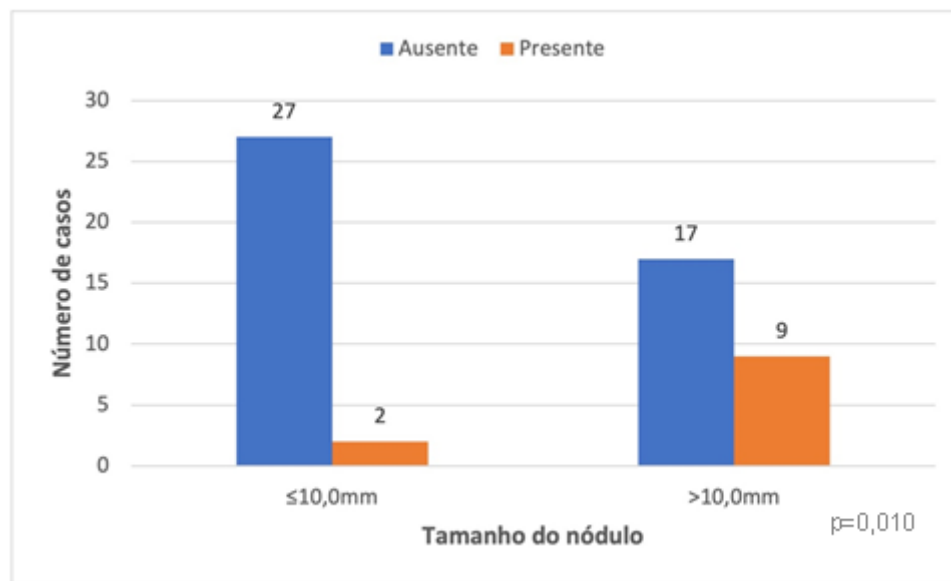
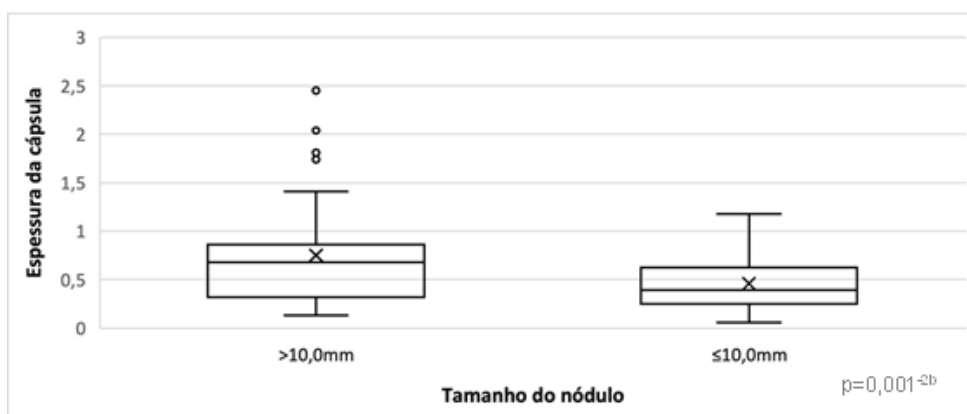
Gráfico 8 - Invasão vascular por tamanho do nódulo

Gráfico 9 - Metástase linfonodal por tamanho do nódulo**Gráfico 10** - Espessura da cápsula por tamanho do nódulo

4.5 Transição epitélio-mesênquima: padrão de expressão e distribuição semiquantitativa dos marcadores imuno-histoquímicos relacionados à TEM nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

4.5.1 E-caderina

4.5.1.1 Padrão de expressão e distribuição semiquantitativa da E-caderina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

Foi analisada e semiquantificada a expressão imuno-histoquímica em membrana da E-caderina nas células neoplásicas epiteliais (Figuras 15 e 16). A distribuição da porcentagem de marcação nas três regiões avaliadas no mesmo

nódulo (centro do tumor, na região periférica próxima à cápsula e na região de infiltração da cápsula, quando presente) encontra-se descrita na Tabela 15.

Nos 103 nódulos estudados observamos expressão em membrana nas células neoplásicas localizadas no centro do tumor e na periferia junto à cápsula tumoral, em diferentes proporções, sendo em sua maioria maior que 70%.

Dentre os 69 casos com infiltração capsular, a expressão da E-caderina nas células neoplásicas no fronte de invasão foi identificada em proporções variáveis, havendo maior número de casos com menor expressão nesta região quando a marcação da E-caderina foi menor ou igual a 30% nas células tumorais. A perda completa de E-caderina foi observada em 5 casos, sendo um puramente folicular, três puramente papilares e um com padrão misto.

Tabela 15 - Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de E-caderina em intervalos de 10% no fronte de invasão, na periferia do tumor junto à cápsula e no centro da neoplasia

Quantidade de células positivas	<i>Fronte de invasão</i>		<i>Periferia do tumor</i>		<i>Centro do tumor</i>	
	n	% de casos	n	% de casos	n	% de casos
0	5	7,2	1	1,0	3	2,9
10%	13	18,8	4	3,9	4	3,9
20%	6	8,7	5	4,9	7	6,8
30%	10	14,5	9	8,7	6	5,8
40%	6	8,7	8	7,8	8	7,8
50%	4	5,9	10	9,7	6	5,8
60%	4	5,9	7	6,8	5	4,9
70%	7	10,1	14	13,5	17	16,5
80%	7	10,1	16	15,5	15	14,6
90%	7	10,1	25	24,3	26	25,2
100%	0	0	4	3,9	6	5,8
Total	69	100	103	100	103	100

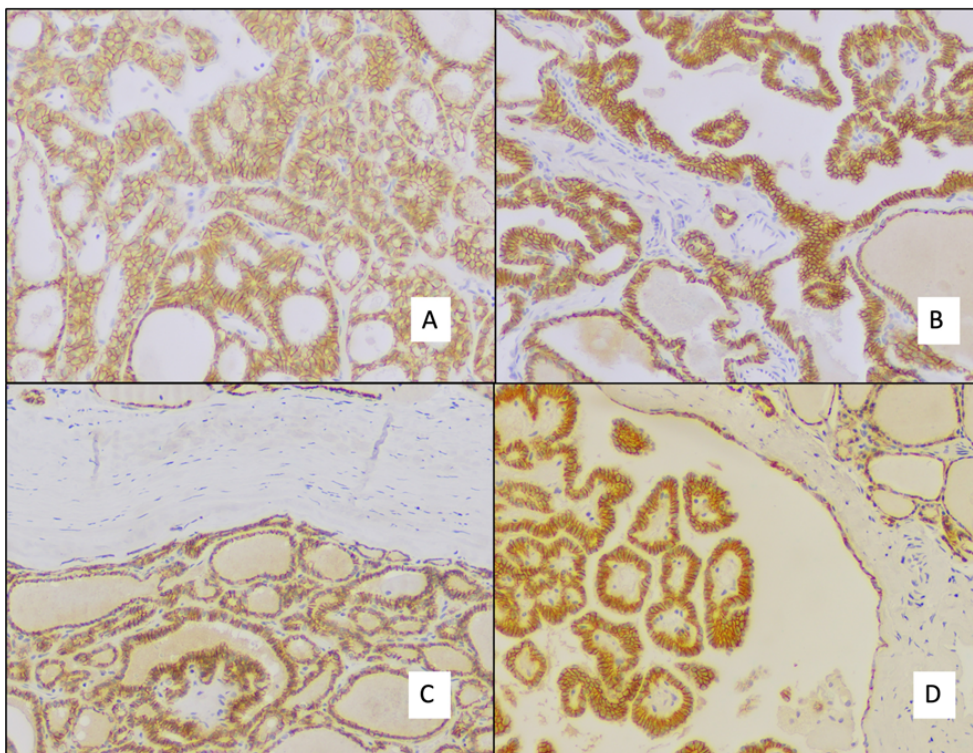


Figura 15 - Padrão de expressão da E-caderina. A e B: marcação no centro do tumor. C e D: marcação na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x

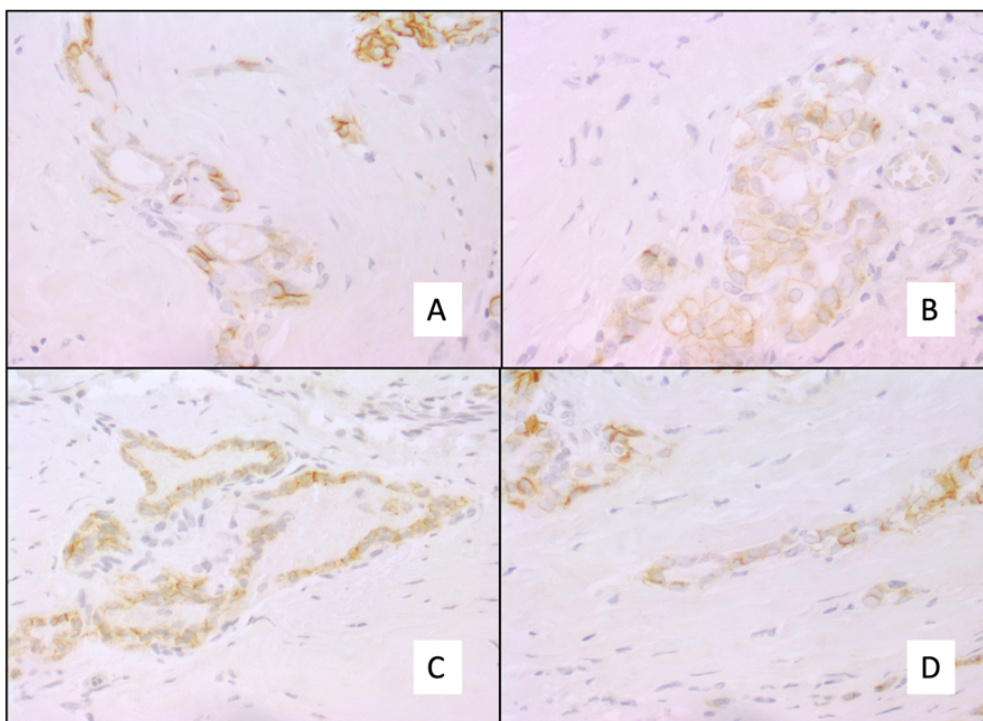


Figura 16 - Expressão da E-caderina no frente de invasão da cápsula. A, B, C e D: Exemplos de diminuição da expressão no frente. Aumento de 400x

4.5.2 β -catenina

4.5.2.1 Padrão de expressão da β -catenina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

O padrão de expressão imuno-histoquímica da β -catenina encontra-se detalhado na Tabela 16 e nas Figuras 17 a 18. Foram analisados os padrões de expressão em membrana, em citoplasma e em núcleo nas células neoplásicas epiteliais.

Nos 103 casos estudados observamos marcação em membrana nas células neoplásicas localizadas no centro do tumor e na periferia junto à cápsula tumoral, não sendo caracterizada marcação citoplasmática ou nuclear nessas regiões.

Nos casos com infiltração da cápsula (69 casos) estudamos a marcação da β -catenina nas células neoplásicas no fronte de invasão. Quarenta e nove casos apresentaram expressão somente em membrana e vinte casos apresentaram ganho do padrão anômalo de marcação citoplasmática. Nenhum caso apresentou marcação nuclear.

Tabela 16 - Padrão de expressão imuno-histoquímica de β -catenina (padrão de marcação em membrana e citoplasmática) no fronte de invasão da cápsula (69 casos), no centro tumoral e na periferia de todas as neoplasias (103 casos)

Fronte de invasão (69 casos com invasão da cápsula)				Periferia do tumor (103 casos)				Centro do tumor (103 casos)			
Marcação membrana		Marcação citoplasmática*		Marcação membrana**		Marcação citoplasmática		Marcação membrana		Marcação citoplasmática	
n	% casos	n	% casos	n	% casos	n	% casos	n	% casos	n	% casos
49	71,0	20	29,0	102	99,1	0	0	103	100	0	0

*Dois casos apresentaram ganho da marcação citoplasmática em todas as células neoplásicas no fronte de invasão e 18 casos apresentaram ganho da marcação citoplasmática em parte das células no fronte de invasão.

**Um caso não apresentou expressão de β -catenina na periferia

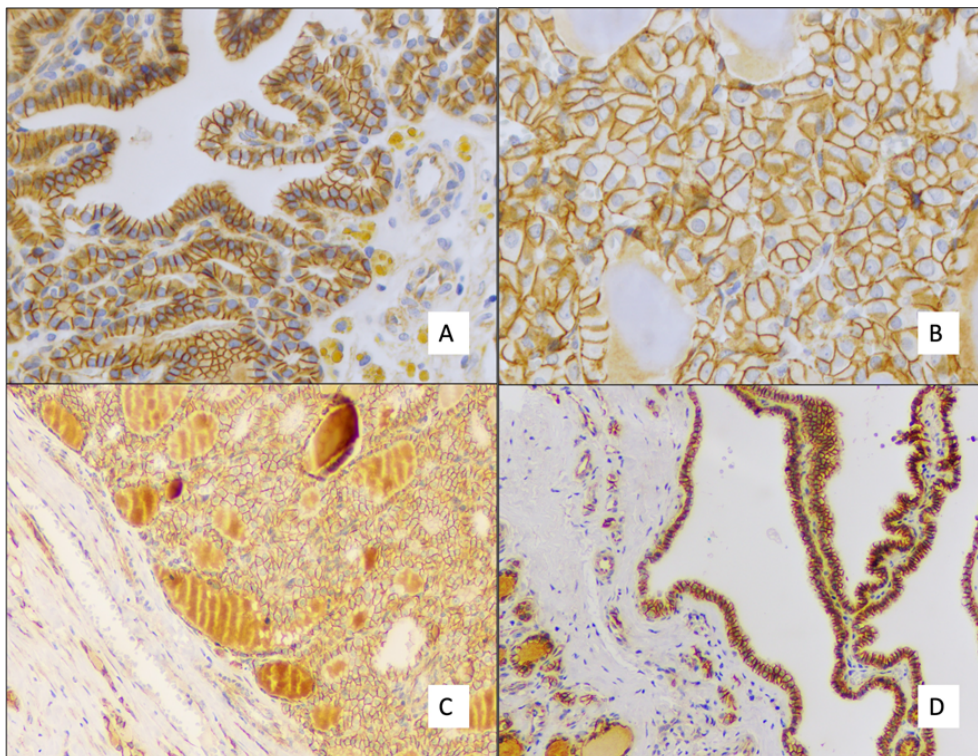


Figura 17 - Marcação da β -catenina em membrana. A e B: Marcação no centro (aumento de 400x). C e D: Marcação na periferia junto à cápsula tumoral. Aumento de 400X em A e B. Aumento de 200x em C e D

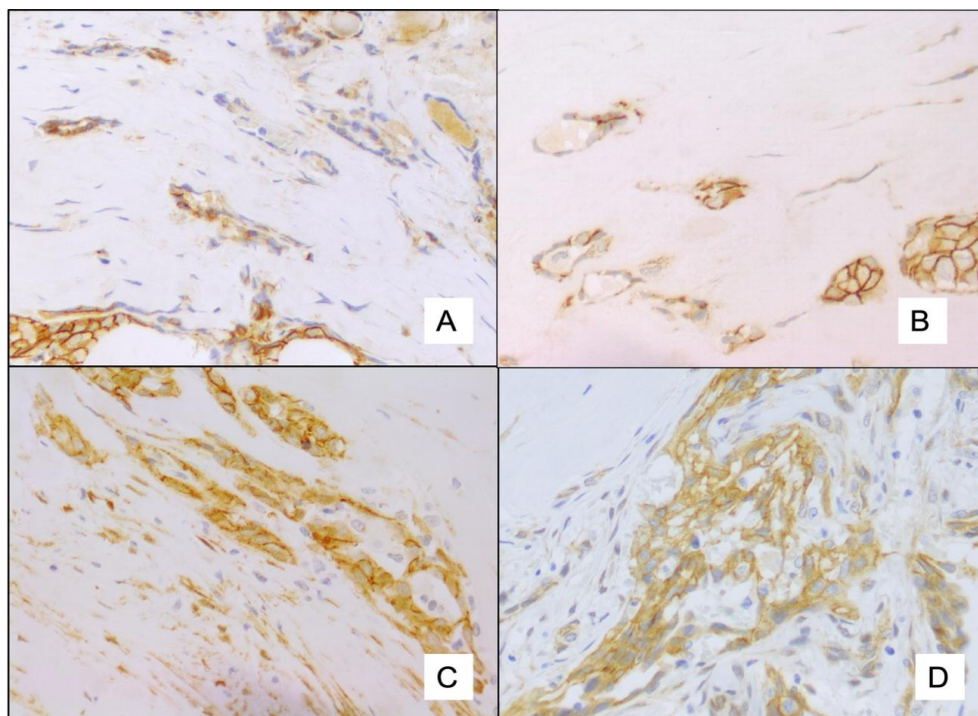


Figura 18 - Marcação de β -catenina no frente de invasão da cápsula. A e B: Marcação em membrana com diminuição da expressão no frente. C e D: Marcação em membrana diminuída, com ganho de expressão em citoplasma. Aumento de 400x

4.5.2.2 Distribuição semiquantitativa da β -catenina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

A distribuição da porcentagem de marcação imuno-histoquímica da β -catenina nas três regiões avaliadas no mesmo nódulo (centro do tumor, na região periférica próxima à cápsula e na região de infiltração da cápsula, quando presente) encontra-se detalhada na Tabela 17, sendo semiquantificada em escalas de 10% apenas a expressão em membrana nas células neoplásicas epiteliais.

Na periferia do tumor, um caso mostrou ausência de expressão, sendo os outros com marcação em membrana de no mínimo 60% no *hot spot*. No centro tumoral, a expressão em membrana foi de no mínimo 40% das células no *hot spot*.

A expressão de membrana de β -catenina nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula foi completamente negativa em 2 casos (apresentaram ganho da marcação citoplasmática). Nos demais casos a expressão em membrana foi variável, sendo identificado um deslocamento com maior número de casos com menor expressão nesta região quando a expressão β -catenina foi menor ou igual a 40% nas células tumorais.

Tabela 17 - Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica em membrana da β -catenina em intervalos de 10% no fronte de invasão, na periferia do tumor junto à cápsula e no centro da neoplasia.

Quantidade de células positivas	Fronte de invasão		Periferia do tumor		Centro do tumor	
	n	% casos	n	% casos	n	% casos
0	2	2,9	1	1,0	0	0
10%	3	4,3	0	0	0	0
20%	2	2,9	0	0	0	0
30%	6	8,7	0	0	0	0
40%	6	8,7	0	0	1	1,0
50%	2	2,9	0	0	1	1,0
60%	7	10,1	6	5,8	3	2,9
70%	10	14,5	10	9,7	14	13,6
80%	21	30,4	28	27,2	29	28,1
90%	10	14,5	53	51,5	47	45,6
100%	0	0	5	4,8	8	7,8
Total	69	100	103	100	103	100

4.5.3 Vimentina

4.5.3.1 Padrão de expressão da Vimentina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

O padrão de expressão imuno-histoquímica de Vimentina encontra-se descrito na Tabela 18 e nas Figuras 19 e 20. Foram avaliados dois padrões de expressão da Vimentina nas células neoplásicas epiteliais: o padrão citoplasmático basal (subnuclear) (“padrão epitelial”) e o padrão citoplasmático difuso (“padrão mesenquimal”).

Nos 103 casos estudados observamos marcação de padrão citoplasmático basal (subnuclear) nas células no centro do tumor e na periferia junto à cápsula dos nódulos, não sendo caracterizada marcação citoplasmática difusa.

Nos casos com invasão da cápsula (69 casos) estudamos a marcação de Vimentina nas células neoplásicas no fronte de invasão, onde observamos 7 casos com ganho da marcação citoplasmática difusa (“padrão mesenquimal”) e 62 casos marcação padrão citoplasmático basal (subnuclear) (“padrão epitelial”).

A Vimentina foi expressa virtualmente em todas as células mesenquimais em todos os casos estudados em padrão citoplasmático difuso.

Tabela 18 - Padrão de expressão imuno-histoquímica de Vimentina (padrão de marcação citoplasmático basal – subnuclear e citoplasmático difuso) no fronte de invasão da cápsula (69 casos), no centro tumoral e na periferia de todas as neoplasias (103 casos)

Fronte de invasão (69 casos com invasão da cápsula)				Periferia do tumor (91 casos)				Centro do tumor (91 casos)			
Marcação citoplasmática basal (subnuclear)		Marcação citoplasmática difusa		Marcação citoplasmática basal (subnuclear)		Marcação citoplasmática difusa		Marcação citoplasmática basal (subnuclear)		Marcação citoplasmática difusa	
n	% casos	n	% casos	n	% casos	n	% casos	n	% casos	n	% casos
62	89,9	7	10,1	103	100	0	0	103	100	0	0

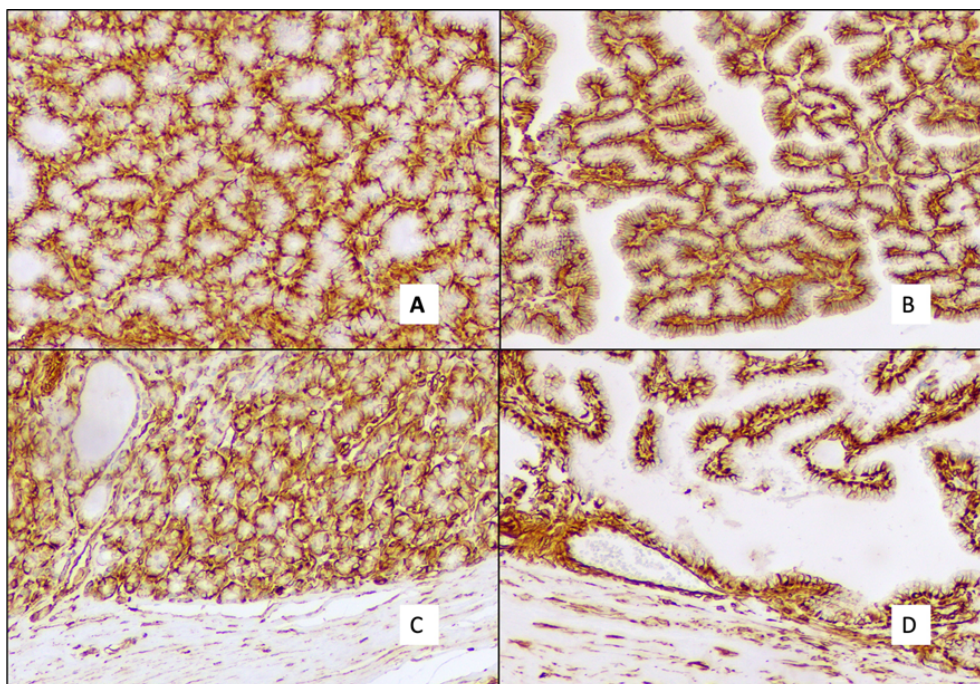


Figura 19 - Expressão de Vimentina padrão citoplasmático basal subnuclear. A e B: no centro do tumor. C e D: na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x

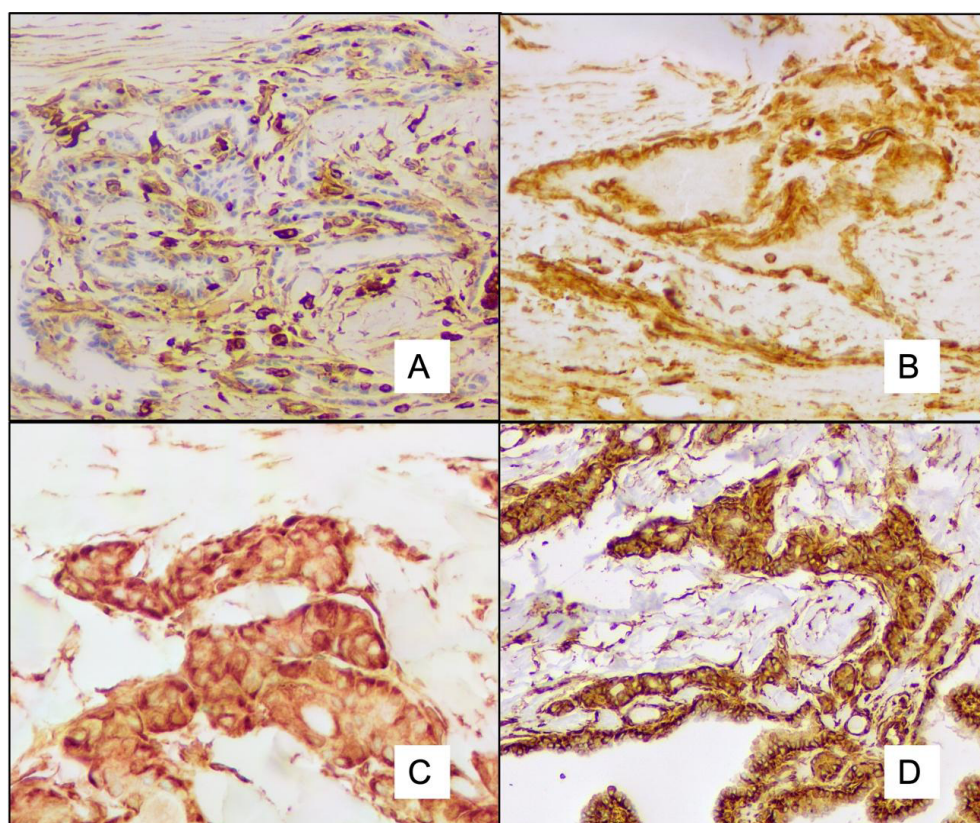


Figura 20 - Marcação de Vimentina no frente de invasão da cápsula. A: Diminuição da marcação citoplasmática basal subnuclear no frente. B, C e D: Marcação citoplasmática difusa no frente. Aumento de 400x

4.5.3.2 Distribuição semiquantitativa da Vimentina nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

A distribuição da porcentagem de marcação imuno-histoquímica da Vimentina nas células neoplásicas epiteliais nas três regiões avaliadas no mesmo nódulo (centro do tumor, na região periférica próxima à cápsula e na região de infiltração da cápsula, quando presente) encontra-se detalhada na Tabela 19, sendo quantificada em escalas de 10% apenas a expressão de padrão citoplasmático basal (subnuclear) (“padrão epitelial”).

Tabela 19 - Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica em padrão citoplasmático basal subnuclear da Vimentina em intervalos de 10% no fronte de invasão tumoral, no centro da neoplasia e na periferia do tumor

Quantidade de células positivas	Fronte de invasão		Periferia do tumor		Centro do tumor	
	n	% casos	n	% casos	n	% casos
0	7	10,1	0	0	0	0
10%	1	1,5	0	0	0	0
20%	1	1,5	1	1,0	1	1,0
30%	0	0	0	0	0	0
40%	0	0	0	0	0	0
50%	0	0	0	0	0	0
60%	0	0	1	1,0	0	0
70%	3	4,3	1	1,0	4	3,9
80%	7	10,1	5	4,8	4	3,9
90%	6	8,7	21	20,4	18	17,4
100%	44	63,8	74	71,8	76	73,8
Total	69	100	103	100	103	100

Na periferia do tumor a expressão citoplasmática basal (subnuclear) foi predominantemente maior que 50% no “hot spot”, com apenas um caso com marcação inferior (20%). No centro tumoral, a expressão de Vimentina nas células neoplásicas foi predominantemente maior que 60% das células no *hot spot*, sendo observado apenas um caso com marcação inferior (20%).

No fronte de invasão da cápsula tumoral 7 casos mostraram ausência de marcação citoplasmática basal (subnuclear) de Vimentina, casos que apresentaram ganho de expressão citoplasmática difusa (“padrão mesenquimal”). Outros 60 casos (89%) mostraram expressão citoplasmática basal (subnuclear) em pelo menos 70% das células neoplásicas. Identificamos

um maior número de casos com menor expressão no fronte de invasão da cápsula quando a marcação de Vimentina foi menor ou igual a 20% nas células neoplásicas.

4.5.4 ZEB-1

4.5.4.1 Padrão de expressão e distribuição semiquantitativa de ZEB-1 nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

A distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de ZEB-1 encontra-se descrita na Tabela 20 e o padrão de marcação exemplificados nas Figuras 21 e 22.

A reação para ZEB-1 resultou negativa nas células epiteliais nas três regiões avaliadas em todos os 103 nódulos estudados.

As células do estroma tumoral apresentaram expressão nuclear tanto no centro e como na região periférica da neoplasia em 102 dos 103 casos, sendo a reação negativa em apenas um caso.

Nos casos com invasão da cápsula (69 casos), estudamos a marcação da ZEB-1 no fronte de invasão, sendo esta presente nas células estromais do tumor em diferentes proporções em 67 casos (97,1%). Dois casos mostraram-se negativos.

Tabela 20 - Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de ZEB-1 nas células estromais tumorais em intervalos de 10% no fronte de invasão, centro tumoral e na periferia

Quantidade de células positivas	Fronte de invasão		Periferia do tumor		Centro do tumor	
	n	% de casos	n	% de casos	n	% de casos
0	2	2,9	1	1,0	1	1,0
10%	21	30,5	13	12,7	11	10,7
20%	10	14,5	12	11,6	16	15,5
30%	8	11,6	27	26,2	16	15,5
40%	12	17,4	23	22,3	24	23,3
50%	3	4,3	9	8,8	14	13,6
60%	10	14,5	16	15,5	18	17,5
70%	3	4,3	2	1,9	3	2,9
80%	0	0	0	0	0	0
90%	0	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0	0
Total	69	100	103	100	103	100

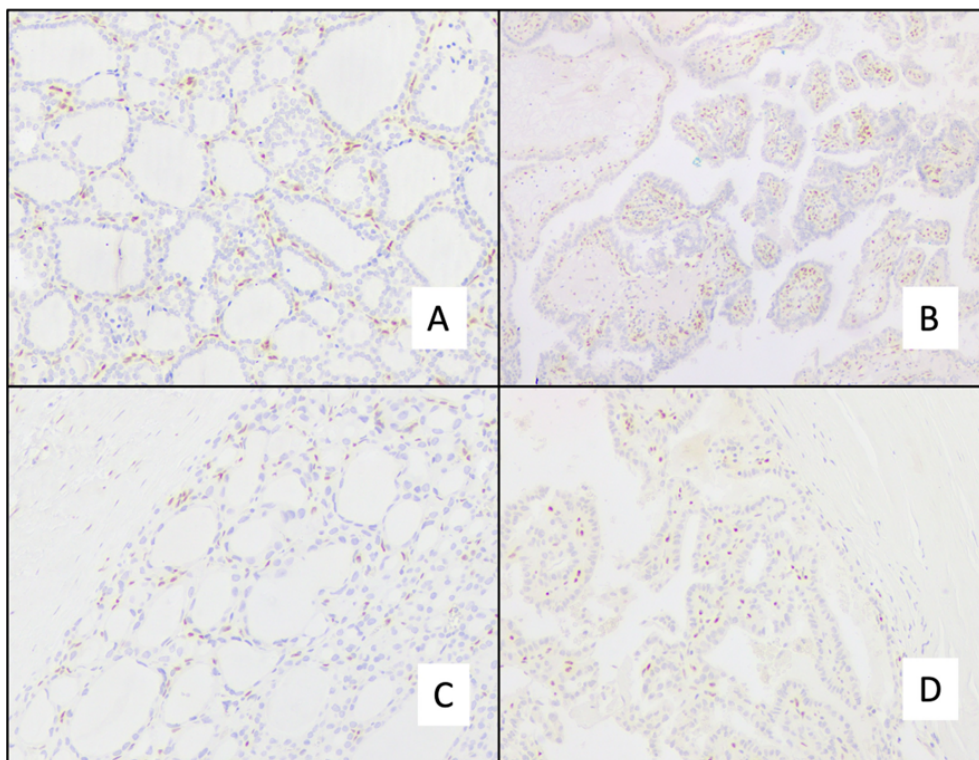


Figura 21 - Expressão do ZEB-1 nas células estromais tumorais. A e B: No centro do tumor. C e D: Na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x

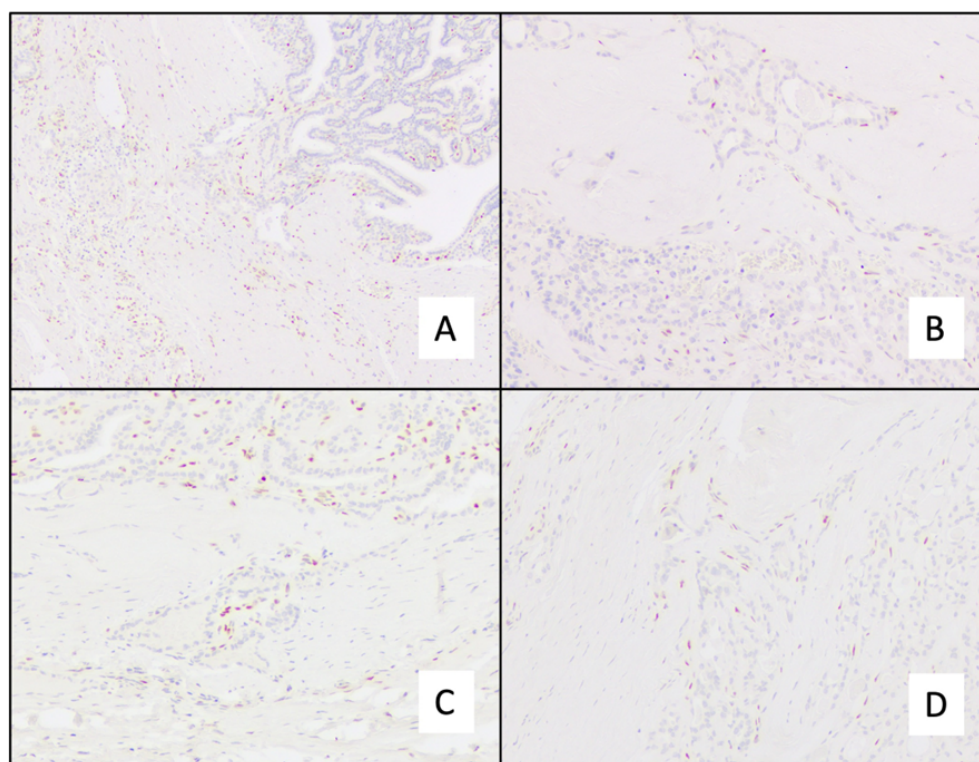


Figura 22 - Expressão de ZEB-1 nas células estromais tumorais no frente de invasão da cápsula. Aumento de 100x em A. Aumento de 200x em B, C e D

4.5.5 ZEB-2

4.5.5.1 Padrão de expressão e distribuição semiquantitativa de ZEB-2 nas células neoplásicas nas diferentes regiões das neoplasias

A distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de ZEB-2 encontra-se descrita na Tabela 21 e o padrão de marcação exemplificado nas Figuras 23 e 24.

A reação para ZEB-2 resultou negativa nas células epiteliais nas três regiões avaliadas em todos os 103 nódulos estudados. As células do estroma tumoral apresentaram expressão nuclear no centro e na periferia da neoplasia em todos os 103 casos, com marcação variando de 10 a 70% das células.

Nos casos com invasão da cápsula (69 casos), estudamos a marcação da ZEB-2 nas células estromais do tumor no fronte de invasão, sendo esta presente em diferentes proporções nos 69 casos.

Tabela 21 - Distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica de ZEB-2 nas células estromais tumorais em intervalos de 10% no fronte de invasão, centro tumoral e na periferia

Quantidade de células positivas	Fronte de invasão		Periferia do tumor		Centro do tumor	
	n	% de casos	n	% de casos	n	% de casos
0	0	0	0	0	0	0
10%	15	21,7	11	10,7	10	9,7
20%	12	17,4	14	13,6	14	13,6
30%	10	14,5	26	25,2	27	26,2
40%	12	17,4	26	25,2	23	22,3
50%	7	10,1	11	10,7	14	13,6
60%	9	13,1	10	9,7	9	8,7
70%	3	4,4	5	4,9	6	5,8
80%	1	1,4	0	0	0	0
90%	0	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0	0
Total	69	100	103	100	103	100

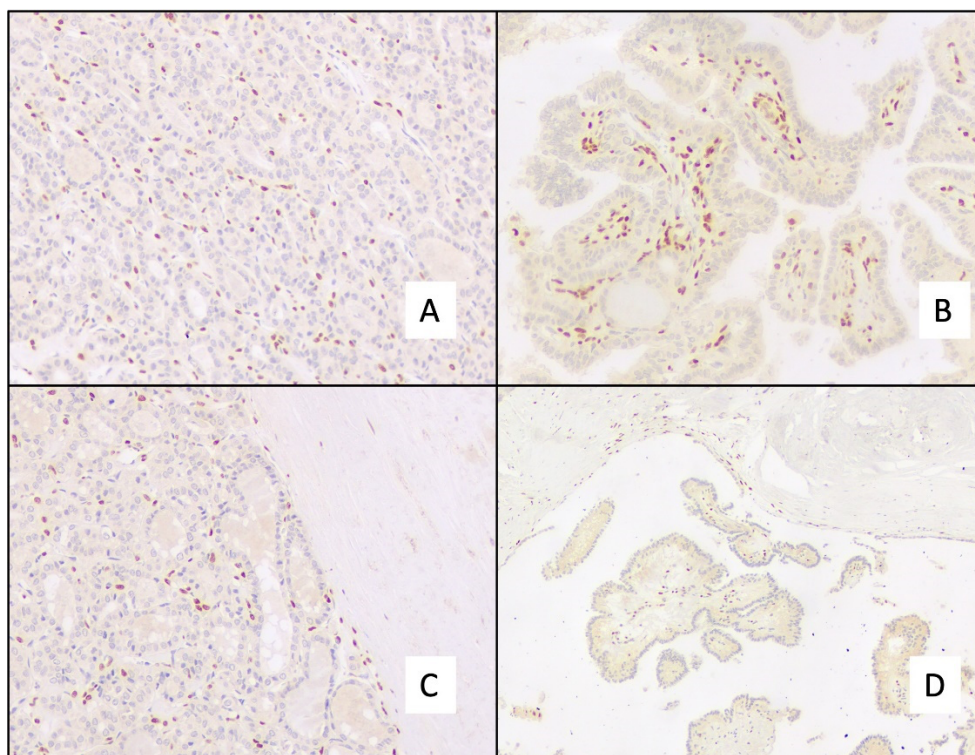


Figura 23 - Expressão do ZEB-2 nas células estromais tumorais. A e B: no centro do tumor. C e D: na periferia junto à cápsula. Aumento de 200x em A, B e C. Aumento de 100x em D

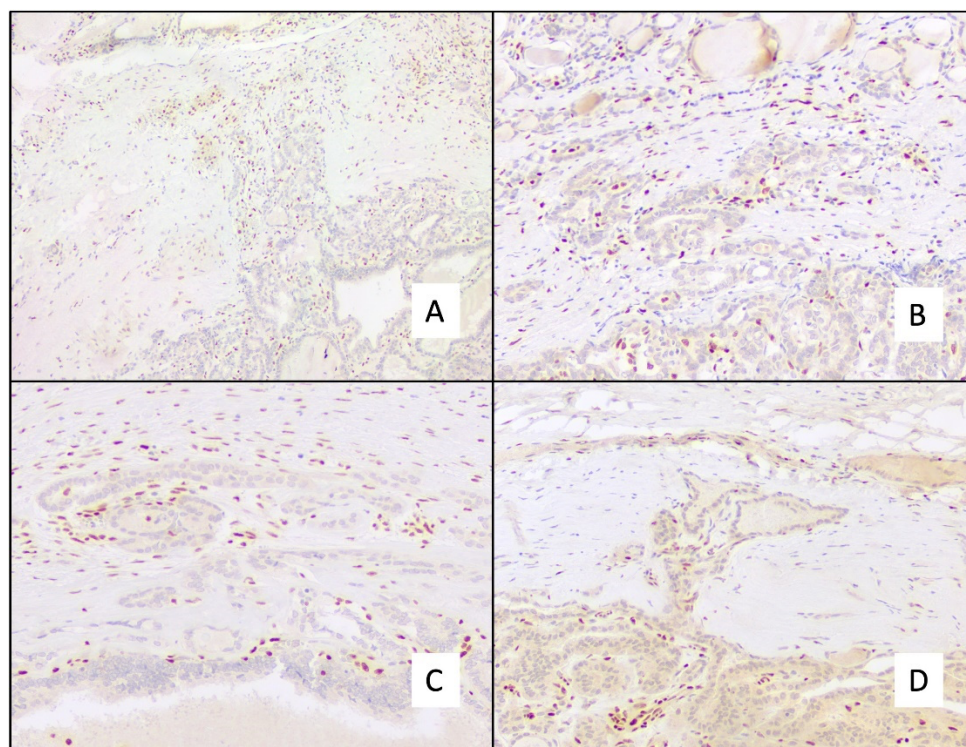


Figura 24 - Expressão de ZEB-2 nas células estromais tumorais no frente de invasão da cápsula. Aumento de 100x em A. Aumento de 200x em B, C e D

4.6 Comparação da distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica dos marcadores relacionados à TEM nas células neoplásicas nas diferentes regiões tumorais amostradas

Realizamos a comparação da porcentagem de expressão imuno-histoquímica dos marcadores relacionados à TEM para todos os nódulos, com o objeto de avaliar a diferença de expressão nas células neoplásicas entre as três regiões estudadas. Comparamos então a expressão entre o centro do tumor e o fronte de invasão da cápsula (“centro – fronte”), entre periferia do tumor junto à cápsula fibrosa e o fronte de invasão da cápsula (“periferia – fronte”) e finalmente entre o centro do tumor e a periferia junto à cápsula (“centro – periferia”) (Tabela 22).

Quando comparamos a porcentagem de expressão imuno-histoquímica entre as células epiteliais do centro tumoral e do fronte de invasão da cápsula nos tumores com infiltração da cápsula (69 casos), observamos diferença significativa para E-caderina ($p < 0,001$), β -catenina ($p < 0,001$) e Vimentina ($p < 0,001$), sendo a marcação no centro maior que a do fronte. O mesmo foi observado para a marcação das células estromais tumorais para ZEB-1 ($p < 0,001$) e ZEB-2 ($p = 0,016$).

Quando comparamos a porcentagem de expressão imuno-histoquímica nas células epiteliais do fronte de invasão da cápsula tumoral e da periferia junto à cápsula nos tumores com infiltração da cápsula (69 casos), observamos diferença significativa para E-caderina ($p < 0,001$), β -catenina ($p < 0,001$) e Vimentina ($p < 0,001$), sendo a marcação na periferia maior que a no fronte. Isso também foi observado para a marcação das células estromais tumorais para ZEB-1 ($p = 0,001$) e ZEB-2 ($p = 0,028$).

Quando comparamos a porcentagem de expressão imuno-histoquímica entre as células epiteliais do centro e da região periferia junto à cápsula de todos os 103 casos, não observamos diferença significativa para E-caderina ($p = 0,368$), β -catenina ($p = 0,637$) e Vimentina ($p = 0,963$). Quando analisamos a marcação das células estromais tumorais para ZEB-1 observamos diferença da marcação entre o centro e a periferia do tumor ($p = 0,013$), sendo a marcação maior no

centro da neoplasia. Já para o ZEB-2 a diferença na marcação não foi significativa ($p=0,433$).

Tabela 22 - Comparação da porcentagem expressão imuno-histoquímica dos anticorpos relacionados a TEM em diferentes regiões tumorais para todos os 103 nódulos estudados (com e sem invasão da cápsula).

	Centro - Frente (%)	Valor de p	Periferia - Frente (%)	Valor de p	Centro- Periferia (%)	Valor de p
E- caderina						
Diferença das Medianas	20	0,006⁻⁶	20	0,001⁻⁸	0	0,368
Valor de V*	1460		1389,5		647,5	
β-catenina						
Diferença das Medianas	10	0,001⁻⁶	10	0,006⁻⁷	0	0,637
Valor de V*	1676,5		1549,5		134	
Vimentina						
Diferença das Medianas	0	0,002⁻¹	0	0,005⁻¹	0	0,963
Valor de V*	360,5		354,5		34	
ZEB-1**						
Diferença das Medianas	10	0,005⁻¹	10	0,001	0	0,013
Valor de V*	1030		971,5		348	
ZEB-2**						
Diferença das Medianas	0	0,016	0	0,028	0	0,433
Valor de V*	697		678,5		190	

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

*V = soma das posições das diferenças positivas

** ZEB-1 and ZEB-2: a expressão nuclear das células estromais foi semiquantificada

4.7 Comparação da distribuição semiquantitativa da expressão imuno-histoquímica dos marcadores relacionados à TEM nas células neoplásicas nas diferentes regiões tumorais amostradas de acordo com padrão arquitetural da neoplasia

4.7.1 Neoplasias sem infiltração da cápsula de acordo com padrão arquitetural

As neoplasias sem infiltração da cápsula tumoral não apresentaram diferença significativa na porcentagem de expressão para todos os marcadores imuno-histoquímicos relacionados à TEM ao comparar a porção central dos

nódulos versus a região periférica não infiltrativa junto à cápsula, independentemente do padrão arquitetural (Tabela 23).

Tabela 23 - Comparação da porcentagem de expressão imuno-histoquímica em diferentes regiões tumorais. Casos sem infiltração da cápsula (NIFTP - 15 casos; padrão puramente papilar - 4 casos; padrão misto - 15 casos).

	NIFTP		Padrão puramente papilar		Padrão misto (10-90% papilas)	
	Centro-Periferia (%)	Valor de p	Centro-Periferia (%)	Valor de p	Centro-Periferia (%)	Valor de p
E-caderina						
Diferença das Medianas	0	0,785	0	>0,999	0	0,409
Valor de V*	9		1		4	
β-catenina						
Diferença das Medianas	0	>0,999	0	>0,999	0	0,345
Valor de V*	5		1		3	
Vimentina						
Diferença das Medianas	0	>0,999	0	>0,999	0	>0,999
Valor de V*	3		1		1	
ZEB-1**						
Diferença das Medianas	0	0,173	0	NA	0	0,053
Valor de V*	6		0		15	
ZEB-2**						
Diferença das Medianas	0	0,850	5	0,371	0	>0,999
Valor de V*	4		3		3	

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

*V = soma das posições das diferenças positivas

** ZEB-1 and ZEB-2: a expressão nuclear das células estromais foi semiquantificada

NA = Não disponível / Valores ausentes

4.7.2 Neoplasias com infiltração da cápsula de acordo com padrão arquitetural

Nódulos com infiltração capsular apresentaram expressão significativamente menor de E-caderina e β -catenina nas células epiteliais do fronte de invasão capsular quando comparados às regiões centrais e periféricas não infiltrativas para todos os grupos de acordo com o padrão arquitetural. Para a Vimentina esta diferença foi observada apenas nos casos puramente papilíferos e nos casos com alguma formação de papilas (mistos).

Expressões significativamente menores de ZEB-1 e ZEB-2 foram observadas nas células estromais tumorais no frente de invasão da cápsula apenas em tumores com formação papilar (padrão puramente papilar e misto) (Tabela 24).

Tabela 24 - Comparação da expressão imuno-histoquímica em diferentes regiões tumorais, de acordo com o padrão arquitetural nas neoplasias com invasão da cápsula tumoral.

Neoplasias de padrão puramente folicular (13 casos)						
	Centro - Frente (%)	Valor de p	Periferia - Frente (%)	Valor de p	Centro - Periferia (%)	Valor de p
E-caderina						
Diferença das Medianas	10	0,014	10	0,005	0	0,850
Valor de V*	36		55		4	
β-catenina						
Diferença das Medianas	10	0,007	10	0,005	0	0,571
Valor de V*	63		55		5	
Vimentina						
Diferença das Medianas	0	>0,999	0	>0,999	0	>0,999
Valor de V*	7,5		7,5		0	
ZEB-1**						
Diferença das Medianas	0	0,536	10	0,470	0	>0,999
Valor de V*	34		35		3,5	
ZEB-2**						
Diferença das Medianas	0	0,064	0	0,119	0	0,345
Valor de V*	3		3		0	
Neoplasias de padrão puramente papilar (25 casos)						
	Centro- Frente (%)	Valor de p	Periferia - Frente (%)	Valor de p	Centro - Periferia (%)	Valor de p
E-caderina						
Diferença das Medianas	20	0,006⁻²	20	0,031⁻²	0	0,314
Valor de V*	249.5		201.5		60	
β-catenina						
Diferença das Medianas	20	0,007⁻¹	20	0,003⁻¹	0	0,119
Valor de V*	248		237		3	
Vimentina						
Diferença das Medianas	0	0,008	0	0,008	0	0,580
Valor de V*	83.5		83.5		3	
ZEB-1**						
Diferença das Medianas	0	0,026	0	0,053	0	0,119
Valor de V*	111		94		18	
ZEB-2**						
Diferença das Medianas	0	0,017	0	0,059	0	0,071
Valor de V*	101.5		93		10	

continua...

...continuação

Tabela 24 - Comparação da expressão imuno-histoquímica em diferentes regiões tumorais, de acordo com o padrão arquitetural nas neoplasias com invasão da cápsula tumoral.

Neoplasias de padrão misto (10-90% de papilas) (31 casos)						
	Centro - Frente (%)	Valor de p	Periferia - Frente (%)	Valor de p	Centro - Periferia (%)	Valor de p
E-caderina						
Diferença das Medianas	10	0,005⁻¹	10	0,004⁻²	0	0,409
Valor de V*	290		271		115.5	
β-catenina						
Diferença das Medianas	10	0,009⁻³	10	0,001⁻²	0	0,484
Valor de V*	325		300		14	
Vimentina						
Diferença das Medianas	0	0,011	0	0,029	0	>0,999
Valor de V*	52.5		49		2	
ZEB-1**						
Diferença das Medianas	10	0,006	10	0,009	0	0,610
Valor de V*	263		275.5		53	
ZEB-2**						
Diferença das Medianas	0	0,037	10	0,053	0	0,824
Valor de V*	190		200.5		30	

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

*V = soma das posições das diferenças positivas

** ZEB-1 and ZEB-2: a expressão nuclear das células estromais foi semiquantificada

4.8 Associação entre a ocorrência de TEM nas células neoplásicas no frente de invasão da cápsula de acordo com cada marcador imuno-histoquímico e as variáveis anatomopatológicas

4.8.1 E-caderina

A perda / diminuição da expressão da E-caderina nas células neoplásicas no frente de invasão da cápsula tumoral foi caracterizada quando a semiquantificação da porcentagem de expressão em membrana foi menor ou igual a 30% (vide item 4.5.1).

Dos 69 casos com infiltração da cápsula, a ocorrência de TEM caracterizada apenas pela avaliação da marcação da E-caderina foi observada no frente de invasão em 34 casos (49,3%) e não mostrou associação estatística com nenhuma variável anatomopatológica estudada (Tabela 25).

Tabela 25 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesênquima para marcação E-caderina no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Transição Epitélio-Mesênquima – E-caderina			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Tamanho			0,899 ^a
≤10mm	17 (48,6%)	16 (47,1%)	
>10mm	18 (51,4%)	18 (52,9%)	
Total	35 (100%)	34 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,62	0,72	0,416 ^b
Padrão arquitetural			0,857 ^a
0% papila	7 (20,0%)	6 (17,6%)	
10-50% papila	8 (22,9%)	6 (17,6%)	
60-90% papila	9 (25,7%)	8 (23,5%)	
100% papila	11 (31,4%)	14 (41,2%)	
Total	35 (100%)	34 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,910 ^a
Ausente	16 (45,7%)	16 (47,1%)	
Presente	19 (54,3%)	18 (52,9%)	
Total	35 (100%)	34 (100%)	
Inflamação intratumoral			0,114 ^c
Ausente	31 (88,6%)	34 (100%)	
Presente	4 (11,4%)	0	
Total	35 (100%)	34 (100%)	
Invasão Vascular			0,709 ^c
Ausente	30 (85,7%)	31 (91,2%)	
Presente	5 (14,3%)	3 (8,8%)	
Total	35 (100%)	34 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,613 ^c
Ausente	32(91,4%)	33 (97,1%)	
Presente	3 (8,6%)	1 (2,9%)	
Total	35 (100%)	34 (100%)	
Metástase linfonodal *			0,873 ^c
Ausente	15 (71,4%)	14 (73,7%)	
Presente	6 (28,6%)	5 (26,3%)	
Total	21 (100%)	19 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

* A avaliação linfonodal foi realizada em 40 dos 69 casos estudados

4.8.2 β-catenina

A perda / diminuição da expressão da β-catenina no fronte de invasão da cápsula tumoral foi caracterizada de duas formas nas células neoplásicas: pelo ganho de expressão anômala em citoplasma e pela diminuição da porcentagem de expressão em membrana, esta última quando a semiquantificação da

porcentagem de expressão em membrana foi menor ou igual a 40% (vide item 4.5.2).

4.8.2.1 Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pelo ganho de expressão anômala em citoplasma da β -catenina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas

A ocorrência de TEM caracterizada pelo ganho da marcação citoplasmática da β -catenina nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula foi observado em 20 dos 69 casos com infiltração da cápsula. O ganho deste padrão anômalo de expressão não teve associação estatística com nenhuma variável anatomopatológica estudada (Tabela 26).

Tabela 26 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesênquima para β -catenina caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Transição Epitélio-Mesênquima - β-catenina (padrão citoplasmático de marcação)			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Tamanho			0,817 ^a
≤10mm	23 (53,1%)	10 (50,0%)	
>10mm	26 (46,9%)	10 (50,0%)	
Total	49 (100%)	20 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,68	0,65	0,855 ^b
Padrão arquitetural			0,495 ^c
0% papila	9 (18,4%)	4 (20,0%)	
10-50% papila	8 (16,3%)	6 (30,0%)	
60-90% papila	14 (28,6%)	3 (15,0%)	
100% papila	18 (36,7%)	7 (35,0%)	
Total	49 (100%)	20 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,147 ^a
Ausente	20 (40,8%)	12 (60,0%)	
Presente	29 (59,2%)	8 (40,0%)	
Total	49 (100%)	20 (100%)	
Inflamação intratumoral			>0,999 ^c
Ausente	46 (93,9%)	19 (95,0%)	
Presente	3 (6,1%)	1 (5,0%)	
Total	49 (100%)	20 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 26 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para β -catenina caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Transição Epitélio-Mesenquima - β-catenina (padrão citoplasmático de marcação)			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Invasão Vascular			0,422 ^c
Ausente	42 (87,5%)	19 (95,0%)	
Presente	7 (14,3%)	1 (5,0%)	
Total	49 (100%)	20 (100%)	
Extensão extratireoidiana			>0,999 ^c
Ausente	46 (93,9%)	19 (95,0%)	
Presente	3 (6,1%)	1 (5,0%)	
Total	49 (100%)	20 (100%)	
Metástase linfonodal *			>0,999 ^c
Ausente	20 (74,1%)	9 (69,2%)	
Presente	7 (25,9)	4 (30,8%)	
Total	27 (100%)	13 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

* A avaliação linfonodal foi realizada em 40 dos 69 casos estudados

4.8.2.2 Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pela semiquantificação da expressão em membrana da β -catenina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas

A ocorrência de TEM caracterizada pela perda / diminuição de expressão em membrana da β -catenina nas células neoplásicas no fronte de invasão foi observada em 19 (27,5%) dos 69 casos com infiltração da cápsula e não teve associação estatística com nenhuma variável anatomopatológica estudada (Tabela 27). No entanto, observamos que 78,9% dos casos com a ocorrência de TEM exibiram mais de 50% de formação de papilas e maior tendência a apresentar extensão extratireoidiana ($p=0,060$).

Tabela 27 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesênquima para β -catenina caracterizada pela porcentagem de expressão nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Transição Epitélio-Mesênquima – β-catenina (porcentagem de expressão)			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Tamanho			0,962 ^a
≤10mm	24 (48,0%)	9 (47,4%)	
>10mm	26 (52,0%)	10 (52,6%)	
Total	50 (100%)	19 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,65	0,73	0,540 ^b
Padrão arquitetural			0,289 ^c
0% papila	11 (22,0%)	2 (10,5%)	
10-50% papila	12 (24,0%)	2 (19,5%)	
60-90% papila	12 (24,0%)	5 (26,3%)	
100% papila	15 (30,0%)	10 (52,6%)	
Total	50 (100%)	19 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,520 ^a
Ausente	22 (44,0%)	10 (52,6%)	
Presente	28 (56,0%)	9 (47,4%)	
Total	50 (100%)	19 (100%)	
Inflamação intratumoral			>0,999 ^c
Ausente	47 (94,0%)	18 (94,7%)	
Presente	3 (6,0%)	1 (5,3%)	
Total	50 (100%)	19 (100%)	
Invasão Vascular			>0,999 ^c
Ausente	44 (88,0%)	17 (89,5%)	
Presente	6 (12,0%)	2 (10,5%)	
Total	50 (100%)	19 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,060 ^c
Ausente	49 (98,0%)	16 (84,2%)	
Presente	1 (2,05)	3 (15,8%)	
Total	50 (100%)	19 (100%)	
Metástase linfonodal *			>0,999 ^c
Ausente	22 (73,3%)	7 (70,0%)	
Presente	8 (26,75)	3 (30,0%)	
Total	30 (100%)	10 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

* A avaliação linfonodal foi realizada em 40 dos 69 casos estudados

4.8.2.3 Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático e pela semiquantificação da expressão em membrana da β -catenina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas

A ocorrência de TEM considerada tanto pelo ganho do padrão de marcação citoplasmático como pela porcentagem de expressão de membrana nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula pela β -catenina foi observada em 35 dos 69 casos com infiltração da cápsula tumoral e também não mostrou associação estatística com nenhuma variável anatomopatológica estudada (Tabela 28). No entanto, apesar de não atingir significância estatística, observamos a ocorrência de TEM nos 4 casos com extensão extratireoidena ($p=0,114$).

Tabela 28 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesênquima para β -catenina caracterizada pela porcentagem de expressão e pelo padrão de expressão citoplasmático em conjunto nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Variáveis	Transição Epitélio-Mesênquima - β -catenina (padrão de marcação citoplasmático e porcentagem de expressão)		Valor de p
	Ausente	Presente	
Tamanho			0,899 ^a
≤10mm	16 (47,1%)	17 (48,6%)	
>10mm	18 (52,9%)	18 (51,4%)	
Total	34 (100%)	35 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,67	0,68	0,986 ^b
Padrão arquitetural			0,476 ^a
0% papila	8 (23,5%)	5 (14,3%)	
10-50% papila	6 (17,6%)	8 (22,9%)	
60-90% papila	10 (29,4%)	7 (20,0%)	
100% papila	10 (29,4%)	15 (42,9%)	
Total	34 (100%)	35 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,068 ^a
Ausente	12 (35,3%)	20 (57,1%)	
Presente	22 (64,7%)	15 (42,9%)	
Total	34 (100%)	35 (100%)	
Inflamação intratumoral			0,356 ^c
Ausente	31 (91,2%)	34 (97,1%)	
Presente	3 (8,8%)	1 (2,9%)	
Total	34 (100%)	35 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 28 - Associação entre variáveis anatomoatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para β -catenina caracterizada pela porcentagem de expressão e pelo padrão de expressão citoplasmático em conjunto nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

<i>Transição Epitélio-Mesenquima - β-catenina</i> (padrão de marcação citoplasmático e porcentagem de expressão)			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Invasão Vascular			0,477 ^c
Ausente	29 (85,3%)	32 (91,4%)	
Presente	5 (14,7%)	3 (8,6%)	
Total	34 (100%)	35 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,114 ^c
Ausente	34 (100%)	31 (88,6%)	
Presente	0 (0%)	4 (11,4%)	
Total	34 (100%)	35 (100%)	
Metástase linfonodal *			>0,999 ^c
Ausente	13 (72,2%)	16 (72,7%)	
Presente	5 (27,8)	6 (27,3%)	
Total	18 (100%)	22 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

* A avaliação linfonodal foi realizada em 40 dos 69 casos estudados

4.8.3 Vimentina

A alteração no padrão de expressão da Vimentina nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula tumoral foi caracterizada de duas formas: pelo ganho de expressão citoplasmático difuso (“padrão mesenquimal”) e pela diminuição da porcentagem de expressão citoplasmática basal (subnuclear) (“padrão epitelial”), esta última caracterizada quando a semiquantificação da porcentagem de expressão citoplasmática basal (subnuclear) foi menor ou igual a 20% (vide item 4.5.3).

4.8.3.1 Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pelo padrão de expressão citoplasmático difuso da Vimentina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas

A ocorrência de TEM caracterizada pelo ganho da marcação citoplasmática difusa (“padrão mesenquimal”) da Vimentina nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula foi observada em 7 dos 69 casos com infiltração da cápsula. O ganho deste padrão de expressão teve associação estatística apenas com a espessura da cápsula tumoral ($p=0,036$), sendo esta mais espessa nos casos com presença de TEM (Tabela 29). Observamos também uma tendência à maior frequência de padrão arquitetural puramente papilar ($p=0,052$) nos casos com a ocorrência de TEM.

Tabela 29 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima para Vimentina caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático difuso nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Transição Epitélio-Mesenquima – Vimentina (ganho do padrão de marcação citoplasmático difuso)			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Tamanho			0,431 ^a
≤10mm	31 (50,0%)	5 (71,4%)	
>10mm	31 (50,0%)	2 (28,6%)	
Total	62 (100%)	7 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,59	1,40	0,036^b
Padrão arquitetural			0,052 ^c
0% papila	13 (21,0%)	0 (0%)	
10-50% papila	14 (22,6%)	0 (0%)	
60-90% papila	16 (25,8%)	1 (14,3%)	
100% papila	19 (30,6%)	6 (85,7%)	
Total	62 (100%)	7 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,437 ^a
Ausente	30 (48,4%)	2 (28,6%)	
Presente	32 (51,6%)	5 (71,4%)	
Total	62 (100%)	7 (100%)	
Inflamação intratumoral			>0,999 ^c
Ausente	58 (93,5%)	7 (100,0%)	
Presente	4 (6,5%)	0 (0%)	
Total	62 (100%)	7 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 29 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesênquima para Vimentina caracterizada pelo ganho do padrão de expressão citoplasmático difuso nas células neoplásicas no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Transição Epitélio-Mesênquima – Vimentina (ganho do padrão de marcação citoplasmático difuso)			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Invasão Vascular			0,588 ^c
Ausente	54 (87,1%)	7 (100%)	
Presente	8 (12,9%)	0 (0%)	
Total	62 (100%)	7 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,354 ^c
Ausente	59 (95,2%)	6 (85,7%)	
Presente	3 (4,8%)	1 (14,3%)	
Total	62 (100%)	7 (100%)	
Metástase linfonodal *			>0,999 ^c
Ausente	25 (73,5%)	4 (66,7%)	
Presente	9 (26,5%)	2 (33,3%)	
Total	34 (100%)	6 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

* A avaliação linfonodal foi realizada em 40 dos 69 casos estudados

4.8.3.2 Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pela semiquantificação da expressão citoplasmática basal (subnuclear) da Vimentina nas células neoplásicas e as variáveis anatomopatológicas

Dos 69 casos com infiltração da cápsula, o fenômeno de TEM caracterizado pela porcentagem de expressão citoplasmática basal (subnuclear) da Vimentina nas células neoplásicas no fronte de invasão foi identificado em 9 casos (13,0%), que compreendem os mesmos 7 casos com ganho marcação citoplasmático difuso (caracterizados como com marcação negativa citoplasmática basal (subnuclear)) somado a 2 casos com porcentagem de expressão menor que 20%. Estes casos apresentaram cápsula significativamente mais espessa ($p=0,040$) e maior frequência de padrão arquitetural puramente papilar ($p=0,036$). As demais variáveis anatomopatológicas não apresentaram associação estatística (Tabela 30).

Tabela 30 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesênquima para Vimentina caracterizada pela porcentagem de expressão no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Variáveis	Transição Epitélio-Mesênquima – Vimentina (porcentagem de expressão citoplasmática basal)		Valor de p
	Ausente	Presente	
Tamanho			>0,999 ^a
≤10mm	29 (48,3%)	4 (44,4%)	
>10mm	31 (51,7%)	5 (55,6%)	
Total	60 (100%)	9 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,59	1,22	0,040^b
Padrão arquitetural			0,036^a
0% papila	13 (21,7%)	0	
10-50% papila	14 (23,3%)	0	
60-90% papila	15 (25,0%)	2 (22,2%)	
100% papila	18 (30,0%)	7 (77,8%)	
Total	60 (100%)	9 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,161 ^a
Ausente	30 (50,0%)	2 (22,2%)	
Presente	30 (50,0%)	7 (77,8%)	
Total	60 (100%)	9 (100%)	
Inflamação intratumoral			0,435 ^a
Ausente	57 (95,0%)	8 (88,9%)	
Presente	3 (5,0%)	1 (11,1%)	
Total	60 (100%)	9 (100%)	
Invasão Vascular			0,584 ^a
Ausente	52 (86,7%)	9 (100%)	
Presente	8 (13,3%)	0	
Total	60 (100%)	9 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,435 ^a
Ausente	57 (95,0%)	8 (88,9%)	
Presente	3 (5,0%)	1 (11,1%)	
Total	60 (100%)	9 (100%)	
Metástase linfonodal *			>0,999 ^a
Ausente	24 (72,7%)	5 (71,4%)	
Presente	9 (27,3%)	2 (28,6%)	
Total	33 (100%)	7 (100%)	

^a Teste Exato de Fisher

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Qui-quadrado de Pearson

* A avaliação linfonodal foi realizada em 40 dos 69 casos estudados

4.9 Associação entre a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula caracterizada pela semiquantificação da expressão de todos os marcadores imuno-histoquímico em conjunto nas células neoplásicas

Dentre os 69 casos com infiltração da cápsula tumoral, 46 (66,7%) demonstraram a ocorrência do fenômeno de TEM nas células neoplásicas no

fron­te de in­vasão da cápsu­la con­side­ran­do a por­cen­ta­gem de ex­pres­são de to­dos os mar­ca­do­res em con­jun­to. Es­ses ca­sos ap­re­sen­ta­vam cápsu­la sig­ni­fi­ca­ti­va­men­te mais es­pes­sa ($p=0,026$).

Em­bo­ra sem sig­ni­fi­cân­cia es­ta­tuís­ti­ca, a ma­io­ria dos ca­sos com oc­orrên­cia de TEM ap­re­sen­to­u mais de 50% de for­ma­ção pa­pi­lar (32 ca­sos (70%), $p= 0,184$) e to­dos os ca­sos com ex­ten­são ex­tra­ti­rei­oi­di­ana de­mon­stra­ram a oc­orrên­cia de TEM (4 ca­sos, $p=0,293$). A pre­sen­ça de in­vasão va­scu­lar e me­tás­ta­se lin­fo­no­dal foi bas­tan­te se­mel­han­te nos ca­sos com ou sem a oc­orrên­cia de TEM (Ta­be­la 31).

Tabela 31 - As­so­cia­ção en­tre va­riá­veis ana­to­mo­pa­to­lô­gi­cas e a oc­orrên­cia de transi­ção e­pi­té­lio-me­sen­qui­ma con­side­ran­do to­dos os mar­ca­do­res jun­tos (69 ca­sos com in­vasão da cápsu­la tu­mo­ral)

Transição Epitélio-Mesênquima			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Tamanho			>0,999 ^a
≤10mm	11 (47,8%)	22 (31,8%)	
>10mm	12 (52,2%)	24 (68,2%)	
Total	23 (100%)	46 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0.52	0.74	0,026^b
Padrão arquitetural			0,184 ^c
0% papila	6 (26,1%)	7 (15,2%)	
10-50% papila	7 (30,4%)	7 (15,2%)	
60-90% papila	5 (21,7%)	12 (26,1%)	
100% papila	5 (21,7%)	20 (43,5%)	
Total	23 (100%)	46 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,494 ^a
Ausente	12 (52,2%)	20 (43,5%)	
Presente	11 (47,8%)	26 (56,5%)	
Total	23 (100%)	46 (100%)	
Inflamação intratumoral			>0,999 ^c
Ausente	21 (91,3%)	44 (95,7%)	
Presente	2 (8,7%)	2 (4,3%)	
Total	23 (100%)	46 (100%)	
Invasão Vascular			>0,999 ^c
Ausente	20 (87%)	41 (89,1%)	
Presente	3 (13%)	5 (10,9)	
Total	23 (100%)	46 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,293 ^c
Ausente	23 (100%)	42 (91,3%)	
Presente	0	4 (8,7%)	
Total	23 (100%)	46 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 31 - Associação entre variáveis anatomopatológicas e a ocorrência de transição epitélio-mesenquima considerando todos os marcadores juntos (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Transição Epitélio-Mesenquima			
Variáveis	Ausente	Presente	Valor de p
Metástase linfonodal *			>0,999 ^c
Ausente	9 (69.2%)	20 (74.1%)	
Presente	4 (30.8%)	7 (25.9%)	
Total	13 (100%)	27 (100%)	

^a Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

* A avaliação linfonodal foi realizada em 40 dos 69 casos estudados

4.10 Exame imuno-histoquímico para expressão da proteína mutada *BRAF^{V600E}*

Nesta série de 103 casos, a reação imuno-histoquímica positiva determinando a presença da proteína mutada *BRAF^{V600E}* foi observada em 27 casos (26,2%) (Figura 25).

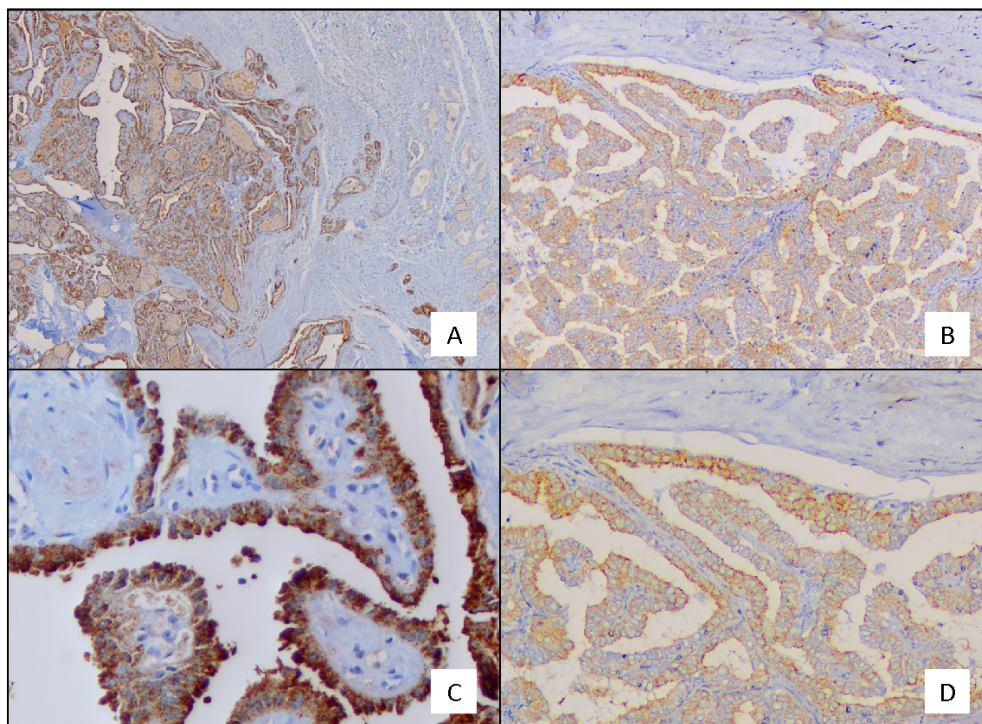


Figura 25 - Reações imuno-histoquímicas para *BRAFV600E* positivas (clone VE1). A e C: Marcação citoplasmática granular forte difusa. B e D: Marcação citoplasmática granular forte focal. Aumento de 40x em A, B. Aumento de 400x em C. Aumento de 200x em D

4.10.1 Caracterização morfológica dos casos positivos para expressão da proteína mutada *BRAF^{V600E}*

Dos 103 nódulos estudados, 27 (26,2%) apresentaram expressão da proteína mutada *BRAF^{V600E}* (detalhamento encontra-se na Tabela 32), sendo que 14 nódulos eram maiores de 10,0 mm (28,6% dos 49 nódulos maiores que 10,0 mm) e 13 menores ou iguais a 10,0 mm (24,1% dos 54 nódulos subcentimétricos).

Todos os casos mutados apresentaram formação de papilas, sendo que a maioria deles (19 nódulos, 70% dos casos com esta mutação) apresentou mais de 50% de formação papilar.

Infiltração da cápsula foi observada em 21 casos (30,4% dos 69 casos com infiltração da cápsula e 77,8% dos casos mutados) e 18 casos com fibrose intratumoral (39,1% dos 46 com fibrose intratumoral e 66,7% dos casos mutados).

Cinco apresentaram metástase linfonodal (45% dos 11 casos com metástase linfonodal e 26,3% dos casos mutados), sendo 3 com padrão arquitetural puramente papilar e 2 com 90% de formação de papilas, todos com infiltração da cápsula.

Nenhum caso com proteína mutada apresentou invasão vascular.

Dois casos apresentaram extensão extratireoidiana, ambos com padrão arquitetural puramente papilar, porém sem invasão vascular ou metástase linfonodal.

Tabela 32 - Detalhamento das variáveis anatomopatológicas nos casos positivos para exame imuno-histoquímico para expressão da proteína mutada *BRAF*^{V600E}

Variável	Número de casos positivos / número total de casos
Tamanho do nódulo	
≤10,0mm	13 / 54 (24,1%)
>10,0mm	14 / 49 (28,6%)
Total	27 / 103
Infiltração da cápsula	
Ausente	6 / 34 (17,6%)
Presente	21 / 69 (30,4%)
Total	27 / 103
Padrão arquitetural	
0% papila (100% folículo)	0 / 28 (0%)
10-50% papila	8 / 23 (34,5%)
60-90% papila	9 / 23 (39,1%)
100% papila	10 / 29 (34,5%)
Total	27 / 103
Fibrose intratumoral	
Ausente	9 / 57 (15,8%)
Presente	18 / 46 (39,1%)
Total	27 / 103
Inflamação intratumoral	
Ausente	26 / 98 (26,5%)
Presente	1 / 5 (20,0%)
Total	27 / 103
Invasão vascular	
Ausente	27 / 95 (28,4%)
Presente	0 / 5 (0%)
Total	27 / 103
Extensão extratireoidiana	
Ausente	27 / 99 (27,3%)
Presente	0 / 4 (0%)
Total	27 / 103
Metástase linfonodal*	
Ausente	14 / 44 (21,8%)
Presente	5 / 11 (45,4%)
Total	27 / 55

*A avaliação linfonodal foi realizada em 55 dos 103 casos estudados

4.10.2 Associação entre expressão da proteína mutada *BRAF*^{V600E} e as variáveis anatomopatológicas

A expressão da proteína mutada *BRAF*^{V600E} teve associação estatística com o padrão arquitetural ($p=0,003$) da neoplasia e com a presença de fibrose intratumoral ($p=0,007$) (Tabela 33).

A positividade para proteína mutada foi predominante nos nódulos com 100% de papilas. A mediana das porcentagens de formação de papilas foi maior nos nódulos positivos para a mutação do gene *BRAF^{V600E}* do que nos casos negativos (Gráfico 11).

Os tumores mutados para o gene *BRAF^{V600E}* apresentaram também maior frequência de fibrose intratumoral (Gráfico 12).

As demais variáveis clínicas e anatomopatológicas não apresentaram associação estatística com a pesquisa de mutação do gene *BRAF^{V600E}*. Porém, nota-se que nenhum caso com a proteína mutada apresentou invasão vascular, sendo que a ocorrência de metástase linfonodal foi praticamente semelhante entre os dois grupos, assim como a infiltração da cápsula.

Tabela 33 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do exame imunohistoquímico para *BRAF^{V600E}*

Variáveis	Resultado exame imuno-histoquímico para <i>BRAF^{V600E}</i>		Valor de p
	Negativo	Positivo	
Gênero			0,203 ^a
Feminino	49 (64,5%)	21 (77,8%)	
Masculino	27 (35,5%)	6 (22,2%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Média das idades (anos)	41,1	43,7	0,295 ^b
Localização			0,768 ^c
Lobo D	24(52,6%)	14 (51,9%)	
Lobo E	33 (43,4%)	11 (40,7%)	
Istmo	3 (3,9%)	2 (7,4%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Tamanho			0,604 ^a
≤ 10,0 mm	41 (53,9%)	13 (48,1%)	
> 10,0 mm	35 (46,1%)	14(51,9%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,54	0,72	0,147 ^b
Padrão arquitetural			0,003^a
0% papila	28 (36,8%)	0	
10-50% papila	15 (19,7%)	8 (29,6%)	
60-90% papila	14 (18,4%)	9 (33,3%)	
100% papila	19 (25,0%)	10 (37,0%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Infiltração da cápsula			0,165 ^a
Ausente	28 (36,8%)	6 (22,2%)	
Presente	48 (63,2%)	21(77,8%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 33 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do exame imuno-histoquímico para *BRAF*^{V600E}

Variáveis	Resultado exame imuno-histoquímico para <i>BRAF</i> ^{V600E}		
	Negativo	Positivo	Valor de p
Fibrose intratumoral			0,007^a
Ausente	48 (63,2%)	9 (33,3%)	
Presente	28(36,8%)	18 (66,7%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Inflamação intratumoral			>0,999 ^c
Ausente	72 (94,7%)	26 (96,3%)	
Presente	4 (5,3%)	4 (3,7%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Invasão vascular			0,079 ^a
Ausente	68 (89,5%)	27 (100%)	
Presente	8 (10,5%)	0 (0%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Extensão extratireoidiana			0,280 ^c
Ausente	74 (97,4%)	25 (92,6%)	
Presente	2 (2,6%)	2 (7,4%)	
Total	76 (100%)	27 (100%)	
Metástase linfonodal*			0,484 ^a
Ausente	30 (83,3%)	14 (73,7%)	
Presente	6 (16,7%)	5 (26,3%)	
Total	36 (100%)	19 (100%)	

^a Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

^d Teste de Wilcoxon para duas amostras

* Considerados os 55 casos com avaliação linfonodal para a análise estatística

Gráfico 11 - Porcentagem de papilas por resultado da reação imuno-histoquímica para mutação do gene *BRAF*^{V600E}

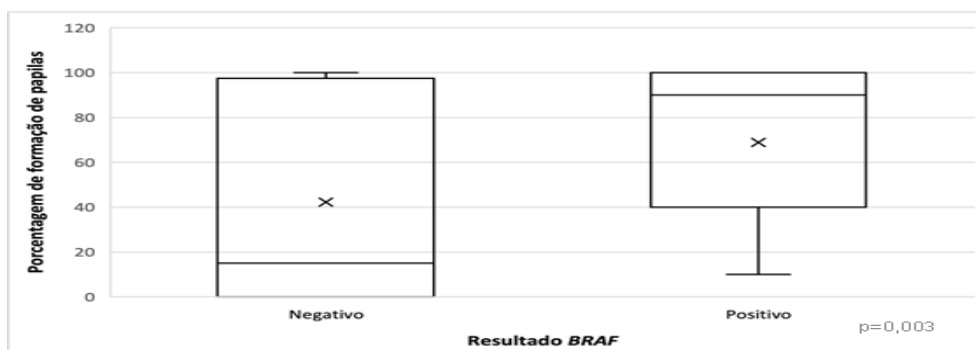
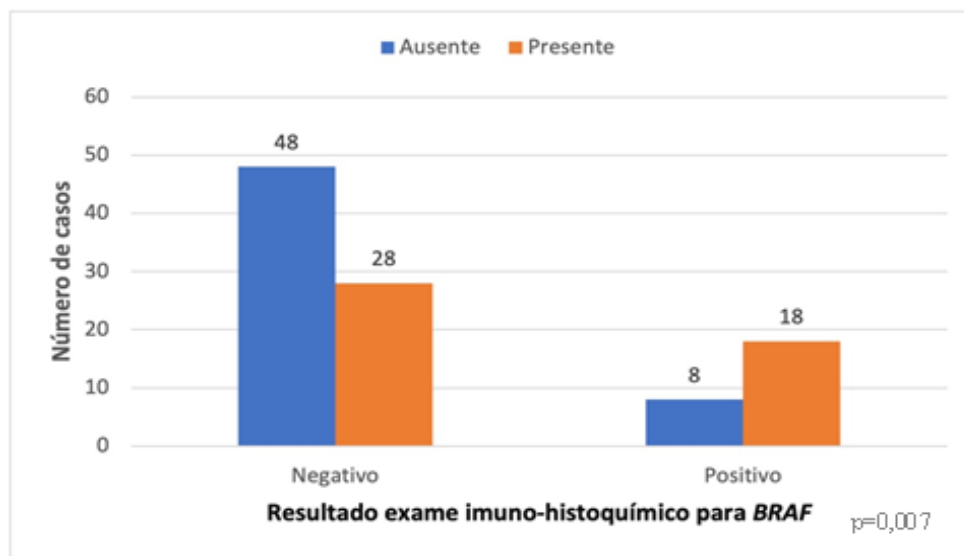


Gráfico 12 - Fibrose intratumoral por resultado da reação imuno-histoquímica para mutação do gene $BRAF^{V600E}$



4.10.3 Associação entre expressão da proteína mutada $BRAF^{V600E}$ e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula

Nos nódulos com infiltração da cápsula tumoral, a expressão da proteína mutada $BRAF^{V600E}$ não teve associação estatística com a ocorrência de transição epitélio-mesênquima no fronte de invasão, seja levando em consideração a semiquantificação da expressão de todos os anticorpos juntos (E-caderina, β -catenina e Vimentina), seja analisando cada um deles separadamente (Tabela 34).

Tabela 34 - Associação entre o resultado do exame imuno-histoquímico para $BRAF^{V600E}$ e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Variáveis	Resultado exame imuno-histoquímica $BRAF^{V600E}$		Valor de p
	Negativo	Positivo	
TEM*			0,267 ^a
Ausente	18 (37,5%)	5 (23,8%)	
Presente	30 (62,5%)	16 (76,2%)	
Total	48 (100%)	21 (100%)	
TEM – E-caderina			0,165 ^a
Ausente	27 (56,2%)	8 (38,1%)	
Presente	21 (43,8%)	13 (61,9%)	
Total	48 (100%)	21 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 34 - Associação entre o resultado do exame imuno-histoquímico para BRAF^{V600E} e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula (69 casos com invasão da cápsula tumoral)

Variáveis	Resultado exame imuno-histoquímica BRAF ^{V600E}		Valor de p
	Negativo	Positivo	
TEM - β-catenina (padrão de marcação citoplasmático)			0,598 ^a
Ausente	35 (72,9%)	14 (66,7%)	
Presente	13 (27,1%)	7 (33,3%)	
Total	48 (100%)	21 (100%)	
TEM - β-catenina (porcentagem de expressão)			0,646 ^a
Ausente	34 (70,8%)	16 (76,2%)	
Presente	14 (29,2%)	5 (23,8%)	
Total	48 (100%)	21 (100%)	
TEM - β-catenina (padrão de marcação citoplasmático e porcentagem de expressão)			0,855 ^a
Ausente	24 (50,0%)	10 (47,6%)	
Presente	24 (50,0%)	11 (52,4%)	
Total	48 (100%)	21 (100%)	
TEM - Vimentina (ganho do padrão de marcação citoplasmático difuso)			0,188 ^b
Ausente	45 (93,8%)	17 (81,0%)	
Presente	3 (6,2%)	4 (19,0%)	
Total	48 (100%)	21 (100%)	
TEM - Vimentina (porcentagem de expressão)			0,439 ^b
Ausente	43 (89,6%)	17 (81%)	
Presente	5 (10,4%)	4 (19,0%)	
Total	48 (100%)	21 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste Exato de Fisher

*TEM considerado a porcentagem de expressão dos três marcadores juntos

4.11 Exame imuno-histoquímico para expressão da proteína mutada NRAS^{Q61R}

Nesta série de 103 casos, a reação imuno-histoquímica para detecção da proteína mutada NRAS^{Q61R} resultou negativa em todos os casos estudados, não tendo sido evidenciada mutação deste gene por este método.

4.12 Sequenciamento para o gene *BRAF*

A reação de sequenciamento para o gene *BRAF* foi realizada em 81 dos 103 nódulos estudados, devido a limitações na extração do DNA.

A mutação *BRAF*^{T1799A} (p. V600E) foi encontrada em 40 casos, com substituição da Timina pela Adenina (T1799A) no éxon 15 e consequente troca da Valina (V) pelo Glutamato (E) no códon 600 da proteína (V600E). Um exemplo de eletroesferograma mostrando a presença da mutação encontra-se na Figura 26.

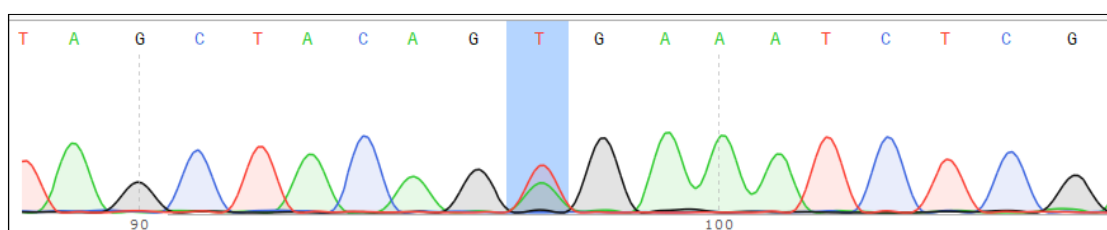


Figura 26 - Eletroesferograma mostrando substituição da timina pela adenina (T1799A) no éxon 15 do gene *BRAF*

4.12.1 Caracterização morfológica dos casos positivos para mutação do gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E)

Dos 81 casos cujo sequenciamento foi realizado, em 3 o resultado foi inconclusivo. Dessa forma, no total foram avaliados o sequenciamento de 78 casos cujo detalhamento encontra-se na Tabela 35. Quarenta casos (51,3%) apresentaram mutação do gene *BRAF*^{V600E} (p. V600E), sendo que 23 nódulos eram menores ou iguais a 10,0 mm (71,8% dos 32 nódulos menores ou iguais a 10,0 mm sequenciados) e 17 maiores que 10,0 mm (36,9% dos 46 nódulos maiores de 10,0 mm sequenciados).

A maioria deles apresentou infiltração da cápsula (33 casos, 62,3% dos 53 casos com infiltração da cápsula sequenciados e 82,5% dos casos mutados), sendo 27 exibindo padrão arquitetural com mais de 50% de formação de papilas, 3 com menos de 50% de formação de papilas e 3 com padrão arquitetural puramente folicular.

Sete casos mutados não apresentaram infiltração da cápsula (28% dos 25 casos sem infiltração da cápsula sequenciados), sendo que todos eles

apresentaram formação de papilas (correspondendo a 54% dos 13 casos sem infiltração da cápsula e com formação de papilas sequenciados), onde 5 mostraram mais de 50% de papilas e 2 menos de 50% de papilas, e 6 deles eram subcentimétricos.

Todos os 12 casos com padrão folicular e sem infiltração da cápsula (NIFTPs) sequenciados não apresentam esta mutação.

Nove casos apresentaram metástase linfonodal (90% dos 10 casos com metástase linfonodal sequenciados e 39,1% dos casos mutados), sendo 6 deles puramente papilares, dois com 90% de papilas e um puramente folicular. Dois casos apresentaram invasão vascular (33% dos 8 casos com invasão vascular sequenciados, 5% dos casos mutados), sendo eles um puramente folicular e um puramente papilar.

Fibrose intratumoral esteve presente em 22 casos (68,7% dos casos com fibrose intratumoral sequenciados, 55% dos casos mutados). Inflamação intratumoral esteve presente em apenas 3 casos e extensão extratireoidiana em apenas 2 casos (Tabela 35).

Tabela 35 - Detalhamento das variáveis patológicas nos casos positivos para mutação do gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E)

Variável	Número de casos com mutação / número total de casos sequenciados (%)
Tamanho do nódulo	
≤10,0mm	23 / 32 (71,8%)
>10,0mm	17 / 46 (36,9%)
Total	40 / 78
Infiltração da cápsula	
Ausente	7 / 25 (28%)
Presente	33 / 53 (62,3%)
Total	40 / 78
Padrão arquitetural	
0% papila	3 / 23 (13%)
10-50% papila	5 / 13 (38,5%)
60-90% papila	13 / 17 (76,4%)
100% papila	19 / 25 (76,0%)
Total	40 / 78

continua...

...continuação

Tabela 35 - Detalhamento das variáveis patológicas nos casos positivos para mutação do gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E)

Variável	Número de casos com mutação / número total de casos sequenciados (%)
Fibrose intratumoral	
Ausente	18 / 46 (39,1%)
Presente	22 / 32 (68,75%)
Total	40 / 78
Inflamação intratumoral	
Ausente	37 / 74 (50%)
Presente	3 / 4 (75%)
Total	40 / 78
Invasão vascular	
Ausente	38 / 70 (54,3%)
Presente	2 / 8 (25%)
Total	40 / 78
Extensão extratireoidiana	
Ausente	38 / 75 (50,7%)
Presente	2 / 3 (66,7%)
Total	40 / 78
Metástase linfonodal*	
Ausente	14 / 29 (48,3%)
Presente	9 / 10 (90,0%)
Total	23 / 39

* A avaliação linfonodal foi realizada em 39 de 78 casos sequenciados

4.12.2 Associação entre mutação do gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E) e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas

A mutação do gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E) teve associação estatística com tamanho dos nódulos ($p=0,002$), padrão arquitetural ($p=0,008^{-3}$), infiltração da cápsula (0,004), fibrose intratumoral ($p=0,010$) e metástase linfonodal ($p=0,027$) (Tabela 36).

As neoplasias sem mutação no gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E) apresentaram menor frequência de fibrose intratumoral (Gráfico 13) e de metástase linfonodal (Gráfico 14).

As neoplasias com mutação no gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E) eram em sua maioria menores ou iguais a 10 mm (tamanho médio de 10,7 mm) (Gráfico 15), apresentaram com maior frequência padrão arquitetural papilar (Gráfico 16), em

sua maioria com mais de 50% de formação de papilar e maior frequência de infiltração da cápsula tumoral (Gráfico 17).

As demais variáveis clínicas e anatomopatológicas não apresentaram associação estatística com a mutação do gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E).

Tabela 36 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do sequenciamento do *BRAF*^{T1799A} (p. V600E)

Variáveis	Resultado sequenciamento <i>BRAF</i> ^{T1799A}		
	Negativo	Positivo	Valor de p
Tamanho			0,002^a
≤ 10,0 mm	9 (23,7%)	23 (57,5%)	
> 10,0 mm	29 (76,3%)	17 (42,5%)	
Total	38 (100%)	40 (100%)	
Tamanho (média – mm)	18,6	10,7	0,006^{-1b}
Espessura da cápsula (média – mm)	0,58	0,67	0,379 ^b
Padrão arquitetural			0,008^{-3c}
0% papila	20 (52,6%)	3 (7,5%)	
10-50% papila	8 (21,1%)	5 (12,5%)	
60-90% papila	4 (10,5%)	13 (32,5%)	
100% papila	6 (15,8%)	19 (47,5%)	
Total	38 (100%)	40 (100%)	
Infiltração da cápsula			0,004^a
Ausente	18 (47,4%)	7 (17,5%)	
Presente	20 (52,6%)	33 (82,5%)	
Total	38 (100%)	40 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,010^a
Ausente	28 (73,7%)	18 (45,0%)	
Presente	10 (26,3%)	22 (55,0%)	
Total	38 (100%)	40 (100%)	
Inflamação intratumoral			0,615 ^c
Ausente	37 (97,4%)	37 (92,5%)	
Presente	1 (2,6%)	3 (7,5%)	
Total	38 (100%)	40 (100%)	
Invasão vascular			0,148 ^c
Ausente	32 (84,2%)	38 (95,0%)	
Presente	6 (14,6%)	2 (5,0%)	
Total	38 (100%)	40 (100%)	
Extensão extratireoidiana			>0,999 ^c
Ausente	37 (97,4%)	38 (95,0%)	
Presente	1 (2,6%)	2 (5,0%)	
Total	38 (100%)	40 (100%)	
Metástase linfonodal*			0,027^c
Ausente	15 (93,8%)	14 (60,9%)	
Presente	1 (6,2%)	9 (39,1%)	
Total	16 (100%)	23 (100%)	

^a Qui-quadrado de Pearson

^b Teste T para amostras independentes (com teste F para duas variâncias)

^c Teste Exato de Fisher

* A avaliação linfonodal foi realizada em 39 dos 78 casos sequenciados.

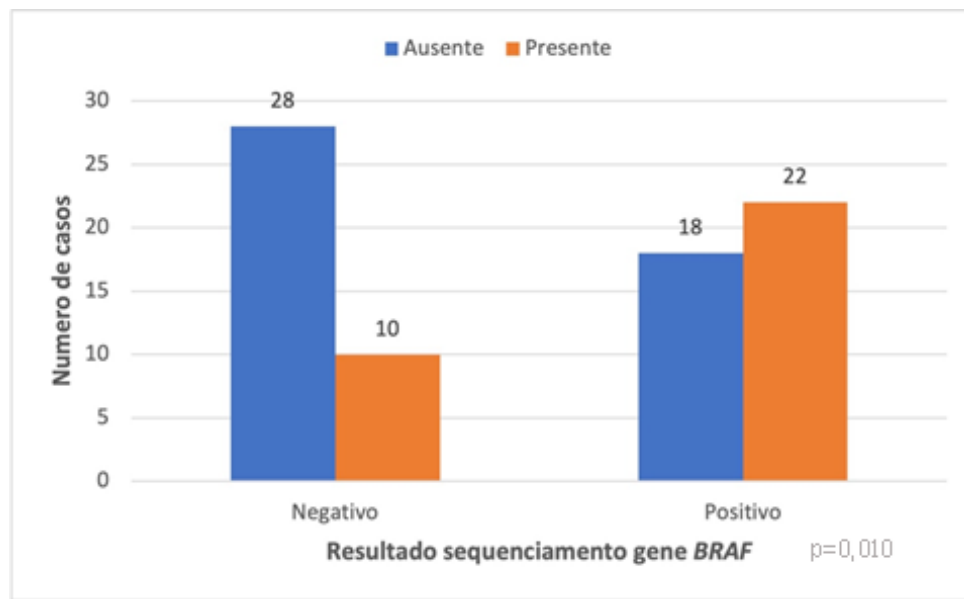
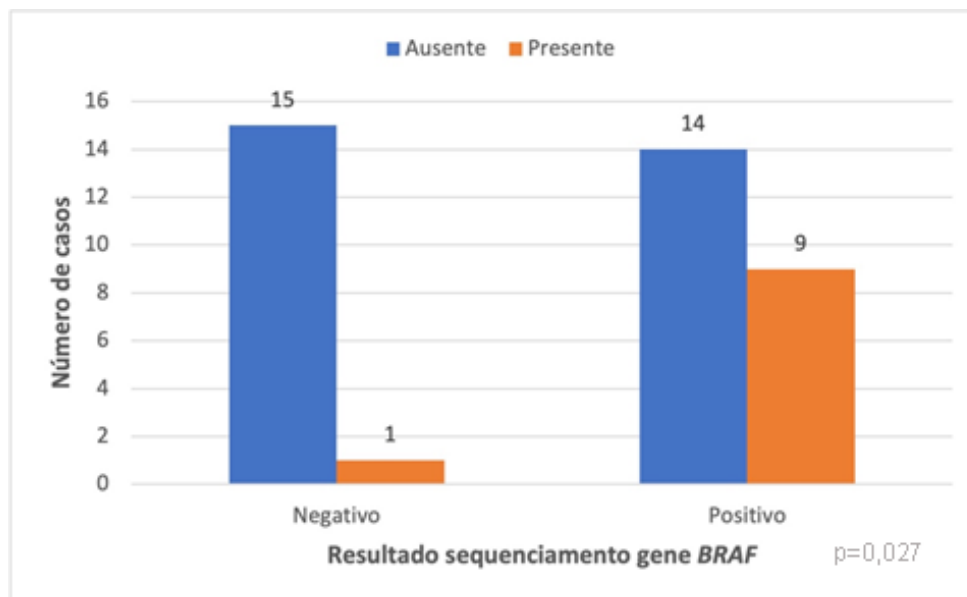
Gráfico 13 - Fibrose intratumoral por resultado do sequenciamento do gene *BRAF***Gráfico 14** - Metástase linfonodal por resultado do sequenciamento do gene *BRAF*

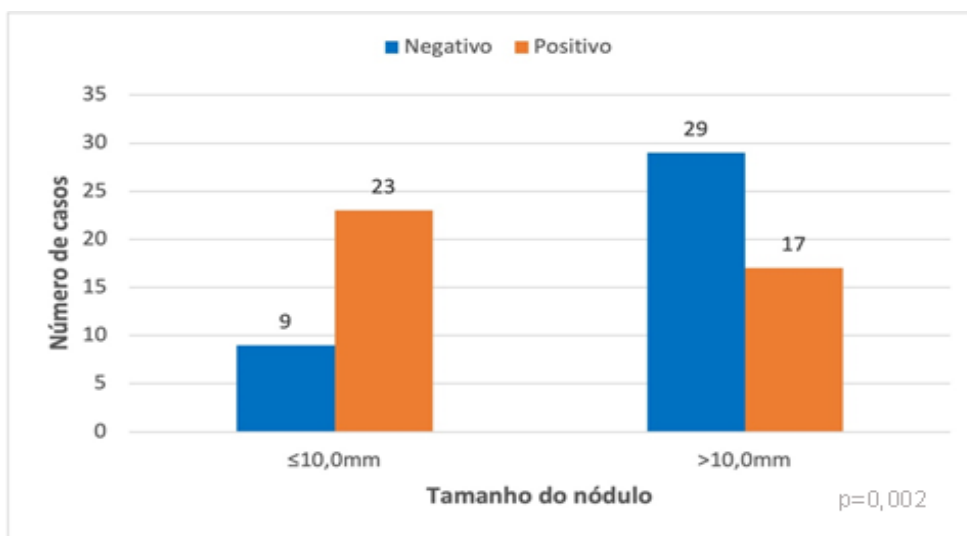
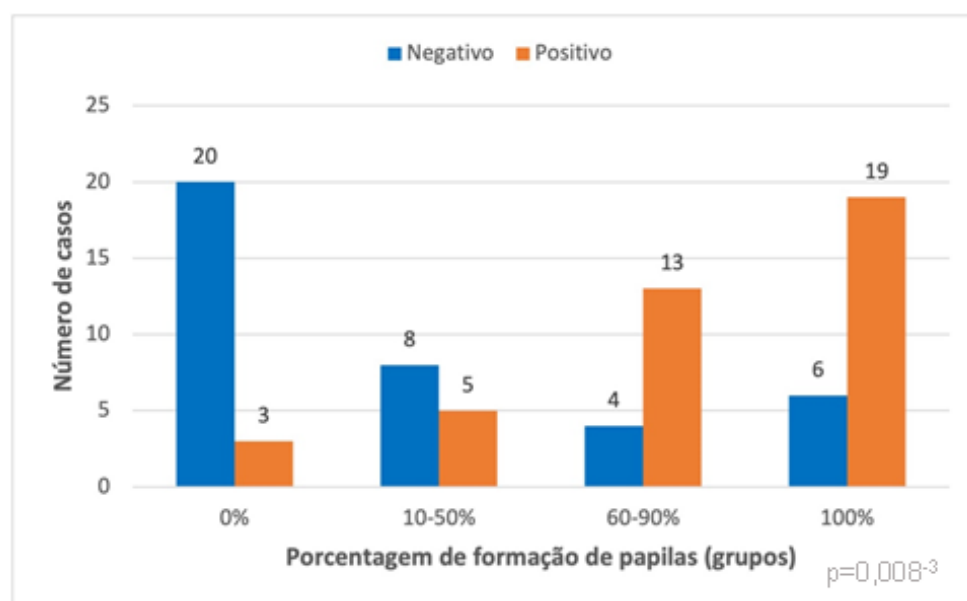
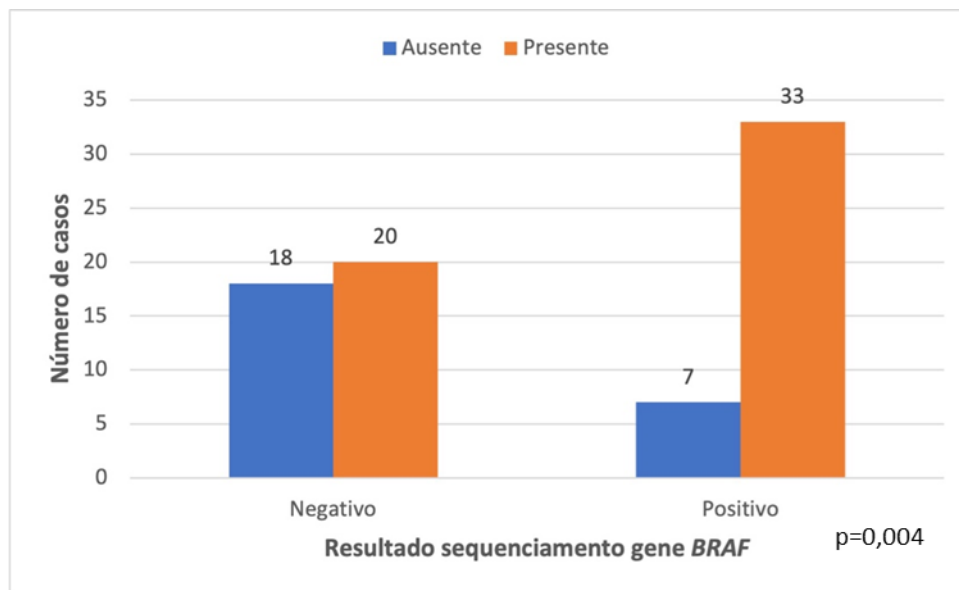
Gráfico 15 - Resultado do sequenciamento do gene *BRAF* por tamanho do nódulo**Gráfico 16** - Resultado do sequenciamento do gene *BRAF* por padrão arquitetural da neoplasia

Gráfico 17 - Infiltração da cápsula tumoral por resultado do sequenciamento do gene *BRAF*

4.12.3 Associação entre mutação do gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E) e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula

Dos 53 nódulos sequenciados com infiltração da cápsula tumoral, 33 apresentaram mutação no gene *BRAF*^{T1799A} (p. V600E). A TEM esteve presente no fronte de invasão em 34 casos sequenciados, levando em consideração a porcentagem de expressão de todos os anticorpos estudados em conjunto.

Quando separamos a ocorrência da TEM de acordo com a presença de cada marcador, este fenômeno esteve presente em 25 casos para porcentagem de expressão da E-caderina, em 15 casos para β -catenina quando considerado o ganho de marcação citoplasmático, 16 casos quando considerada a porcentagem de marcação em membrana para β -catenina, 26 casos quando considerada ambas avaliações da β -catenina em conjunto, 4 casos para Vimentina quando considerado o ganho de marcação citoplasmática difusa e 6 casos para Vimentina quando analisada a porcentagem de expressão citoplasmática basal no fronte.

A presença de mutação no gene *BRAF* não teve associação estatística com a ocorrência de TEM, seja levando em consideração o resultado de todos os anticorpos juntos (E-caderina, β -catenina e Vimentina), seja analisando cada um deles separadamente (Tabela 37). Porém, observamos uma tendência de

ocorrência de TEM nos casos com a mutação (quando analisados todos os marcadores em conjunto, $p=0,094$).

Tabela 37 - Associação entre mutação do gene $BRAF^{T1799A}$ e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula nos 53 casos sequenciados

Resultado sequenciamento $BRAF^{T1799A}$			
Variáveis	Negativo	Positivo	Valor de p
TEM*			0,094 ^a
Ausente	10 (50,0%)	9 (27,3%)	
Presente	10 (50,0%)	24 (72,7%)	
Total	20 (100%)	33 (100%)	
TEM – E-caderina			0,415 ^a
Ausente	12 (60,0%)	16 (48,5%)	
Presente	8 (40,0%)	17 (51,5%)	
Total	20 (100%)	33 (100%)	
TEM - β-catenina (padrão de marcação citoplasmático)			0,830 ^a
Ausente	14 (70,0%)	24 (72,7%)	
Presente	6 (30,0%)	9 (27,3)	
Total	20 (100%)	33 (100%)	
TEM - β-catenina (porcentagem de expressão)			0,521 ^a
Ausente	15 (75,0%)	22 (66,7%)	
Presente	5 (25,0%)	11 (33,3%)	
Total	20 (100%)	33 (100%)	
TEM - β-catenina (padrão de marcação e porcentagem de expressão)			0,500 ^a
Ausente	9 (45,0%)	18 (54,5%)	
Presente	11 (55,0%)	15 (45,5%)	
Total	20 (100%)	33 (100%)	
TEM – Vimentina (padrão de marcação citoplasmático difuso)			0,584 ^b
Ausente	19 (95,0%)	30 (90,9%)	
Presente	1 (5,0%)	3 (9,1%)	
Total	20 (100%)	33 (100%)	
TEM – Vimentina (porcentagem de expressão)			0,390 ^b
Ausente	19 (95,0%)	28 (84,8%)	
Presente	1 (5,0%)	5 (15,2%)	
Total	20 (100%)	33 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson

^b Teste Exato de Fisher

*TEM considerado a porcentagem de expressão dos três marcadores juntos

4.12.4 Comparação do sequenciamento para detecção de mutação do gene *BRAF* e a detecção imuno-histoquímica da proteína mutada *BRAF*^{V600E}

O sequenciamento é considerado o método padrão ouro para detecção de mutações somáticas nas neoplasias. Comparando os resultados dos 78 casos sequenciados com o exame imuno-histoquímico para mutação *BRAF*^{V600E}, observamos que todos os 38 casos negativos no sequenciamento foram negativos na imuno-histoquímica. Por outro lado, dentre os 40 casos com mutação detectada geneticamente, 17 mostraram expressão imuno-histoquímica desta proteína mutada, enquanto tal reação mostrou-se negativa em 23 casos (Tabela 38). O valor preditivo positivo do exame imuno-histoquímico foi 100%, mostrando que todos os casos positivos para o exame imuno-histoquímico tinham a mutação detectada no sequenciamento. Por outro lado, o valor preditivo negativo foi 62,3%, mostrando um resultado falso negativo do exame imuno-histoquímico em 37,7% dos casos.

Tabela 38 - Comparação entre os resultados do exame imuno-histoquímico e sequenciamento para *BRAF*

Resultado sequenciamento <i>BRAF</i> ^{T1799A}			
	Negativo	Positivo	Total
Resultado reação imuno-histoquímica anti- <i>BRAF</i> ^{V600E}			
Negativo	38	23	61
Positivo	0	17	17
Total	38	40	78

4.13 Sequenciamento para o gene *NRAS*

A reação de sequenciamento para o gene *NRAS* foi realizada em 81 dos 103 nódulos estudados, devido a limitações na extração do DNA.

A mutação no gene *NRAS*^{A182G} (p. Q61R) foi encontrada em 4 casos, com substituição da Adenina pela Guanina (A182G) no éxon 3 e consequente troca do aminoácido Glutamina (Q) para Arginina (R) no códon 61 da proteína (Q61R). Um exemplo de eletroesferograma mostrando a presença da mutação encontra-se na Figura 27.

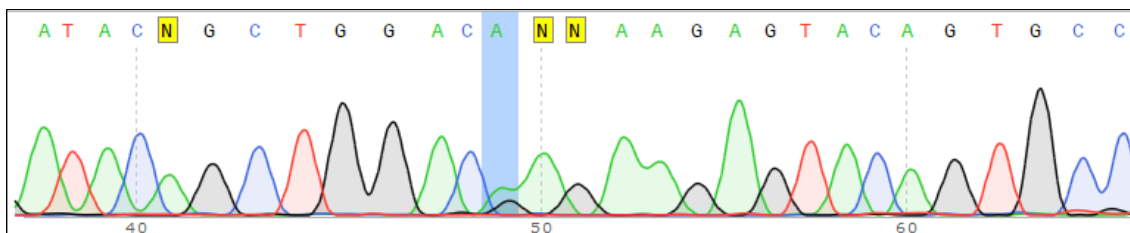


Figura 27 - Eletroesferograma mostrando substituição da Adenina pela Guanina (A182G) no éxon 3 do gene *NRAS*

4.13.1 Caracterização morfológica dos casos positivos para Mutação *NRAS*^{A182G} (p. Q61R)

Dos 81 casos cujo sequenciamento foi realizado, 4 (4,9%) apresentaram mutação do gene *NRAS*^{A182G} (p. Q61R), sendo que 2 casos são maiores de 10,0 mm e 2 menores ou iguais a 10,0 mm (Tabela 39).

Em relação ao padrão arquitetural, dos 15 casos classificados como NIFTP nesta casuística, 12 foram sequenciados e 2 apresentaram mutação do gene *NRAS*^{A182G} (17%), sendo ambos subcentimétricos. Os outros dois casos mutados apresentam infiltração da cápsula, sendo que um apresentou padrão arquitetural puramente folicular e outro com mais de 60% de formação de papilas.

Invasão vascular, extensão extratireoidiana, fibrose e inflamação intratumoral não foram observadas em nenhum dos casos com esta mutação.

A avaliação de linfonodos regionais foi realizada em 42 dos 81 casos sequenciados, dos quais apenas 2 apresentaram mutação do gene *NRAS*^{A182G} e ausência acometimento linfonodal.

Tabela 39 - Detalhamento das variáveis patológicas nos casos positivos para mutação do gene *NRAS*

Variável	Número de casos com mutação / número total de casos sequenciados (%)
Tamanho do nódulo	
≤10,0mm	2 / 32 (6,2%)
>10,0mm	2 / 49 (4,08%)
Total	4 / 81
Infiltração da cápsula	
Ausente	2 / 25 (8,0%)
Presente	2 / 56 (3,6%)
Total	4 / 81
Padrão arquitetural	
0% papila (100% folículo)	3 / 23 (13,0%)
10-50% papila	0 / 14 (0%)
60-90% papila	1 / 18 (5,5%)
100% papila	0 / 26 (0%)
Total	4 / 81
Fibrose intratumoral	
Ausente	4 / 46 (8,7%)
Presente	0 / 35 (0%)
Total	4 / 81
Inflamação intratumoral	
Ausente	4 / 77 (5,2%)
Presente	0 / 4 (0%)
Total	4 / 81
Invasão vascular	
Ausente	4 / 73 (5,5%)
Presente	0 / 8 (0%)
Total	4 / 81
Extensão extratireoidiana	
Ausente	4 / 77 (5,2%)
Presente	0 / 4 (50%)
Total	4 / 81
Metástase linfonodal*	
Ausente	2 / 31 (6,4%)
Presente	0 / 11 (0%)
Total	2 / 42

* A avaliação linfonodal foi realizada em 42 dos 81 casos sequenciados

4.13.2 Associação entre mutação *NRAS*^{A182G} (p. Q61R) e as demais variáveis clínicas e anatomopatológicas

Nenhuma das variáveis clínicas e histológicas estudadas apresentou associação estatística com a presença de mutação no gene *NRAS*^{A182G} (p. Q61R) (Tabela 40). No entanto, mesmo com apenas 4 casos apresentando tal mutação, observamos uma tendência dos casos com mutação deste gene

terem padrão arquitetural puramente folicular e de não apresentar fibrose intratumoral.

Tabela 40 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do sequenciamento do gene *NRAS*

Variáveis	Resultado sequenciamento <i>NRAS</i> ^{A182G}		
	Negativo	Positivo	Valor de p
Gênero			0,597 ^a
Feminino	52 (67,5%)	2 (50,0%)	
Masculino	25 (32,5%)	2 (50,0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Média das idades (anos)	41,5	46,5	0,582 ^b
Localização			0,463 ^a
Lobo D	43 (55,8%)	1 (25,0%)	
Lobo E	29 (37,7%)	3 (75%)	
Istmo	5 (6,5%)	0 (0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Tamanho			0,645 ^a
≤ 10,0 mm	30 (39,0%)	2 (50,0%)	
> 10,0 mm	47 (61,0%)	2 (50,0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Espessura da cápsula (média – mm)	0,65	0,62	0,279 ^b
Padrão arquitetural			0,136 ^a
0% papila	20 (26,0%)	3 (75,0%)	
10-50% papila	14 (18,2%)	0 (0%)	
60-90% papila	17 (22,1%)	1 (25,0%)	
100% papila	26 (33,8%)	0 (0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Infiltração da cápsula			0,583 ^a
Ausente	23 (29,9%)	2 (50,0%)	
Presente	54 (70,1%)	2 (50,0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Fibrose intratumoral			0,129 ^a
Ausente	42 (54,5%)	4 (100%)	
Presente	35 (45,5%)	0 (0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Inflamação intratumoral			>0,999 ^a
Ausente	73 (94,8%)	4 (100%)	
Presente	4 (5,2%)	0 (0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Invasão vascular			>0,999 ^a
Ausente	69 (89,6%)	4 (100%)	
Presente	8 (10,4%)	0 (0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	
Extensão extratireoidiana			>0,999 ^c
Ausente	73 (94,8%)	4 (100%)	
Presente	4 (5,2%)	0 (0%)	
Total	77 (100%)	4 (100%)	

continua...

...continuação

Tabela 40 - Associação entre variáveis clínico-patológicas e o resultado do sequenciamento do gene *NRAS*

Variáveis	Resultado sequenciamento <i>NRAS</i> ^{A182G}		
	Negativo	Positivo	Valor de p
Metástase linfonodal*			>0,999 ^c
Ausente	29 (72,5%)	2 (100%)	
Presente	11 (27,5%)	0 (0%)	
Total	40 (100%)	2 (100%)	

^a Teste Exato de Fisher

^b Teste T para amostras independentes

* A avaliação linfonodal foi realizada em 42 dos 81 casos sequenciados.

4.13.3 Associação entre mutação *NRAS*^{A182G} (p. Q61R) e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula

Dos 56 nódulos sequenciados com infiltração da cápsula tumoral, apenas 2 casos apresentaram mutação para o gene *NRAS*^{A182G} (p. Q61R). A TEM esteve presente no fronte de invasão em 36 dos casos sequenciados, levando em consideração a porcentagem de expressão de todos os anticorpos estudados em conjunto.

Quando separamos a ocorrência da TEM de acordo com a caracterização de cada marcador imuno-histoquímico, este fenômeno esteve presente 26 casos para porcentagem de expressão da E-caderina, em 17 casos para β -catenina quando considerado o padrão de marcação citoplasmático, 16 casos quando considerada a porcentagem de marcação em membrana para β -catenina, 28 casos quando considerada ambas avaliações da β -catenina em conjunto, 5 casos para Vimentina quando considerado o ganho de marcação citoplasmática difusa e 7 casos para Vimentina quando analisada a porcentagem de expressão citoplasmática basal no fronte.

A presença de mutação no gene *NRAS*^{A182G} não teve associação estatística com a ocorrência de transição epitélio-mesênquima, seja levando em consideração o resultado de todos os marcadores juntos (E-caderina, β -catenina e Vimentina), seja analisando cada um deles separadamente (Tabela 41).

Tabela 41 - Associação entre mutação do gene *NRAS*^{A182G} e a ocorrência de TEM no fronte de invasão da cápsula

Resultado sequenciamento <i>NRAS</i>^{A182G}			
Variáveis	Negativo	Positivo	Valor de p
TEM*			>0,999 ^a
Ausente	19 (35,2%)	1 (50,0%)	
Presente	35 (64,8%)	1 (50,0%)	
Total	54 (100%)	2 (100%)	
TEM – E-caderina			0,415 ^a
Ausente	29 (53,7%)	1 (50,0%)	
Presente	25 (46,3%)	1 (50,0%)	
Total	54 (100%)	2 (100%)	
TEM - β-catenina (padrão de marcação citoplasmático)			0,518 ^a
Ausente	38 (70,4%)	1 (50,0%)	
Presente	16 (29,6%)	1 (50,0%)	
Total	54 (100%)	2 (100%)	
TEM - β-catenina (porcentagem de expressão)			>0,999 ^a
Ausente	38 (70,4%)	2 (100%)	
Presente	16 (29,6%)	0	
Total	54 (100%)	2 (100%)	
TEM - β-catenina (padrão de marcação e porcentagem de expressão)			>0,999 ^a
Ausente	27 (50,0%)	1 (50,0%)	
Presente	27 (50,0%)	1 (50,0%)	
Total	54 (100%)	2 (100%)	
TEM – Vimentina (padrão de marcação citoplasmático difuso)			>0,999 ^a
Ausente	49 (90,7%)	2 (100%)	
Presente	5 (9,3%)	0	
Total	54 (100%)	2 (100%)	
TEM – Vimentina (porcentagem de expressão)			0,390 ^b
Ausente	47 (87,0%)	2 (100%)	
Presente	7 (13,05)	0	
Total	54 (100%)	2 (100%)	

^a Teste Qui-quadrado de Pearson^b Teste Exato de Fisher

*TEM considerado a porcentagem de expressão dos três marcadores juntos

4.13.4 Comparação entre o sequenciamento para detecção de mutação do gene *NRAS* e a detecção imuno-histoquímica da proteína mutada *NRAS*^{Q61R}

O sequenciamento é considerado o método padrão ouro para detecção de mutações somáticas nas neoplasias. Comparando os resultados dos 81 casos sequenciados com o exame imuno-histoquímico, observamos que todos os 77 casos negativos no sequenciamento foram negativos na imuno-

histoquímica. Por outro lado, 4 casos cuja mutação foi detectada geneticamente, a proteína não foi identificada ao exame imuno-histoquímico (Tabela 42). O valor preditivo positivo do exame imuno-histoquímico foi 0% e o valor preditivo negativo foi 95,1%, mostrando um resultado falso negativo do exame imuno-histoquímico em 4,9% dos casos.

Tabela 42 - Comparação entre os resultados do exame imuno-histoquímico e sequenciamento para *NRAS*

	Resultado sequenciamento <i>NRAS</i> ^{A182G}		
	Negativo	Positivo	Total
Resultado reação imuno-histoquímica anti-<i>NRAS</i>			
Negativo	77	4	81
Positivo	0	0	0
Total	77	4	81

5 DISCUSSÃO

Delineamos este estudo para compreender de forma mais detalhada as neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero, no que tange a importância da integridade da cápsula tumoral e do padrão arquitetural em associar-se a características histológicas com reconhecido significado prognóstico nestes tumores, como invasão vascular e metástase linfonodal.

Caracterizamos a ocorrência do fenômeno de transição epitélio-mesênquima pelo método imuno-histoquímico nestas neoplasias. Estudamos também alguns aspectos de seu perfil molecular mediante pesquisa de mutação dos genes *BRAF* e *NRAS*.

5.1 Características histológicas

A relevância da cápsula tumoral e do padrão arquitetural das neoplasias da tireoide vem sendo questionada há muitos anos. Em 1984, por exemplo, Carcangiu *et al.* (1) mostraram que carcinomas papilíferos completamente envoltos por cápsula tinham, em geral, evolução favorável, mas que poderiam apresentar metástase em linfonodos cervicais. Naquele estudo, a porcentagem de papilas e folículos teve pouco significado prognóstico.

A infiltração da cápsula tumoral é característica histológica essencial para o diagnóstico de carcinoma folicular da tireoide e sua extensão tem valor prognóstico naquelas neoplasias (110, 111). Desde a definição do NIFTP, a avaliação da cápsula tumoral e do padrão arquitetural nas neoplasias encapsuladas com características nucleares de carcinoma papilífero tem ganhado maior importância na prática do patologista (7, 19).

Na quinta edição do livro da OMS de classificação de tumores endócrinos (3), a avaliação cuidadosa da cápsula tumoral foi destacada como essencial tanto para o diagnóstico de NIFTP quanto para subclassificar o carcinoma papilífero variante folicular encapsulado invasivo em três grupos com prognósticos distintos: minimamente invasivo (somente invasão capsular), angioinvasivo encapsulado (invasão venosa presente com ou sem infiltração capsular) e amplamente invasivo.

Não há consenso definido na literatura para caracterização da infiltração da cápsula tumoral nas neoplasias da tireoide, o que leva, na prática diagnóstica,

a grande variação interobservadores (112, 113). Alguns autores consideram a necessidade de infiltração de toda a espessura da cápsula para esta ser considerada como marcador de malignidade da neoplasia, enquanto outros propõem que infiltração parcial da cápsula já seja suficiente para a caracterização de carcinoma (111).

Na presente série abordamos esta questão subdividindo a infiltração da cápsula em permeação parcial ou como a sua transposição completa pela neoplasia. A infiltração da cápsula tumoral esteve presente em 67% dos nossos casos e aqui mostrou-se um pré-requisito para invasão vascular e para metástase linfonodal, variáveis histológicas com reconhecido significado prognóstico (12, 23). A ocorrência desses dois fenômenos foi semelhante quando os tipos de infiltração foram analisados separadamente, mostrando que na nossa casuística a permeação parcial da cápsula foi suficiente para caracterização de malignidade. Tal achado, no entanto, deverá ser avaliado mais detalhadamente em estudos futuros com casuísticas mais robustas e acompanhamento a longo prazo dos pacientes.

Akbulut *et al.* (114) relataram em artigo de 2021 achados semelhantes aos nossos, mostrando que metástases linfonodais foram mais frequentes nos casos de carcinomas papilíferos clássicos encapsulados com invasão capsular. Vale ressaltar que naquele trabalho os autores definiram infiltração da cápsula tumoral apenas com transposição completa. Diferentemente, em trabalho de Rivera *et al.* (115) foram encontrados 4 casos de metástases linfonodais entre 15 casos de carcinoma papilíferos clássicos encapsulados sem invasão capsular ou invasão vascular. Essa discrepância de resultados pode ser secundária a invasão de vasos linfáticos no interior da própria neoplasia, a um comportamento mais agressivo dos tumores daquela série, possivelmente relacionado ao maior tamanho dos tumores estudados (média de 25,0 mm), ou devido a uma amostragem menos completa da região da cápsula tumoral (dado não informado no artigo). No nosso trabalho, a cápsula tumoral foi avaliada por completo em todas as neoplasias sem invasão da cápsula.

Um achado interessante no nosso estudo foi a estreita associação de maior espessura da cápsula e a chance de invasão tumoral. Essa observação é importante pois pode auxiliar o patologista na busca de invasão capsular nas

neoplasias encapsuladas da tireoide de padrão folicular com características nucleares de carcinoma papilífero, principalmente em tumores com maiores dimensões, uma vez que a exclusão dessa característica é essencial para que seja feito o diagnóstico de NIFTP (116). De acordo com Mete e Asa (113), o patologista tem a responsabilidade de identificar áreas suspeitas de invasão da cápsula e reconhecer a necessidade de realizar níveis seriados dos blocos dessas regiões para garantir que não seja perdido um foco de invasão da cápsula tumoral. Porém, ainda não há consenso sobre o número de cortes aprofundados ideal do bloco de parafina a ser realizado nos casos duvidosos (114).

No nosso estudo, o padrão arquitetural foi a principal característica histológica associada à ocorrência de infiltração da cápsula, sendo os tumores com 100% de formação de papilas os que mais infiltraram. Este achado foi previamente relatado por Rivera *et al.* (115), que observaram que 65% dos carcinomas papilíferos clássicos encapsulados apresentaram invasão da cápsula tumoral contrastando com 38% dos carcinomas papilíferos variante folicular encapsulados. De forma similar, Baloch *et al.* (117) identificaram invasão da cápsula tumoral em 26% dos carcinomas papilíferos clássicos encapsulados versus 18% carcinomas papilíferos variante folicular encapsulados. Esses achados, no entanto, diferem do observado por Giani *et al.* (118), que encontraram frequência mais elevada de infiltração da cápsula tumoral nos carcinomas papilíferos variante folicular encapsulados, apesar de a diferença em relação aos carcinomas papilíferos clássicos encapsulados não ter sido estatisticamente significativa naquele estudo.

A necessidade da avaliação da porcentagem de formação de papilas nas neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero motivou muitos trabalhos desde o reconhecimento do NIFTP. Artigo publicado em 2017 que comparou pacientes com carcinoma papilífero variante folicular encapsulada invasiva e não invasiva divididos em dois grupos de acordo com a ausência absoluta de papilas versus presença de raras papilas ($\leq 1\%$) mostrou evolução clínica desfavorável nos pacientes com tumores exibindo raras papilas, com maiores taxas de metástase linfonodal (119). De forma semelhante, ao final de 2019, Xu *et al.* (106) mostraram que carcinomas papilíferos

encapsulados com maior porcentagem de papilas estão associados a maior risco de metástase linfonodal, mesmo na ausência de invasão da cápsula. Naquela casuística, os tumores com mais de 50% de formação de papilas tiveram um risco de 50% de metástase linfonodal, enquanto tumores encapsulados não invasivos com menos de 10% de formação de papilas não desenvolveram metástase linfonodal.

Metástase linfonodal não se mostrou estatisticamente associada à porcentagem de formação de papilas no nosso estudo, porém 10 dos 11 casos com metástase linfonodal apresentaram mais de 50% de formação de papilas, achado semelhante ao observado por Xu *et al.* em 2019 (106). Ressalte-se, entretanto, que, em nosso trabalho, todos esses casos metastáticos apresentaram infiltração da cápsula.

A presença de invasão vascular, por outro lado, foi observada com maior frequência nos tumores com menor porcentagem de formação de papilas, apesar de também não estatisticamente associada. Dos 8 casos com invasão vascular identificados no nosso estudo, 4 eram puramente foliculares e 2 com menos de 50% de papilas, todos eles com infiltração da cápsula e permeação de ramos venosos da cápsula. Esse achado é concordante com o descrito na literatura (115), em que os carcinomas papilíferos variante folicular encapsulados infiltrativos assemelham-se aos carcinomas foliculares da tireoide, que invadem localmente a cápsula e, quando há envolvimento de vasos, frequentemente são os vasos sanguíneos da cápsula tumoral e não os linfáticos. A distinção entre essas duas entidades se baseia apenas na presença ou não de características nucleares de carcinoma papilífero (109).

As neoplasias de padrão arquitetural folicular encapsuladas da tireoide podem ser classificadas como benignas, de baixo risco e malignas de acordo com a OMS. Estão incluídos na categoria baixo risco NIFTP, tumor folicular de potencial maligno incerto, tumor bem diferenciado de potencial maligno incerto e tumor trabecular hialinizante (3). Diferentemente, as neoplasias encapsuladas de padrão arquitetural papilar só são classificadas como malignas.

Trabalhos recentes vêm mostrando evolução favorável dos carcinomas papilíferos variante clássica encapsulados da tireoide, principalmente quando não apresentam invasão da cápsula tumoral ou invasão vascular (118, 120).

Ghossein *et al.* (121) mostraram recentemente que tumores encapsulados da tireoide medindo até 40 mm e sem invasão vascular têm evolução indolente e podem ser tratados com cirurgia conservadora (apenas lobectomia). Na nossa casuística, por exemplo, nenhuma das neoplasias sem infiltração da cápsula tumoral apresentou invasão vascular ou metástase linfonodal. Dentre esses casos observamos 15 com arquitetura puramente folicular (sendo classificados como NIFTP) e 19 com padrão arquitetural papilar (sendo 4 puramente papilares) classificados atualmente pela OMS como carcinoma papilífero variante clássica encapsulado. Acreditamos que novos estudos em séries maiores desse padrão de tumor acompanhados clinicamente por longo prazo poderão comprovar nossa hipótese de que neoplasias bem diferenciadas com arquitetura papilar podem também ser outro subtipo de tumor papilar encapsulado com prognóstico favorável, semelhante ao NIFTP.

As neoplasias menores ou iguais a 10 mm constituíram um pouco mais da metade da nossa casuística de neoplasias encapsuladas da tireoide com núcleos de carcinoma papilífero. Essa maior prevalência de tumores pequenos reflete o que é observado na prática diagnóstica atual em grandes centros, com maior frequência de diagnósticos precoces das neoplasias da tireoide devido principalmente a técnicas mais avançadas de imagem e à avaliação anatomopatológica mais detalhada (122).

Tumores pequenos, principalmente menores que 20 mm, têm excelente prognóstico, com baixas taxas de recorrência local e à distância (23). Na nossa casuística, por exemplo, as neoplasias subcentimétricas tiveram menor frequência de invasão vascular e metástase linfonodal, porém observamos dois casos de metástase linfonodal nessa classe de tumores.

Trabalhos de vigilância ativa conduzidos por institutos japoneses para microcarcinomas da tireoide (123, 124) mostraram resultados favoráveis, estes interpretados como sendo provavelmente mais relacionados à natureza indolente da doença do que à eficácia do tratamento cirúrgico neste contexto.

De acordo com a Associação Japonesa de Endócrino Cirurgia, são candidatos para vigilância ativa pacientes com microcarcinomas de baixo risco, ou seja, sem evidência clínica de metástase linfonodal ou à distância, sem evidências de invasão local e idade maior que 20 anos (125). Por outro lado, a

Associação Americana de Tireoide recomenda fortemente a realização de cirurgia na presença de nódulo com citologia positiva para carcinoma papilífero, independente do tamanho. Porém, em 2015, a vigilância ativa passou a ser considerada uma alternativa à cirurgia imediata nos microcarcinomas papilíferos de baixo risco (30).

Diante do aumento da frequência de diagnóstico de microcarcinoma papilífero e de seu excelente prognóstico na maioria dos casos, em 2003 Rosai *et al.* (126) propuseram a nomenclatura de “Microtumor Papilífero” para casos selecionados de carcinomas papilíferos subcentimétricos.

Os critérios de elegibilidade dos casos para serem renomeados como “Microtumor Papilífero” foram atualizados em 2020 por Aliyev *et al.* (127) e foi sugerido na ocasião a adesão de tal nomenclatura nos microcarcinomas papilíferos diagnosticados incidentalmente em tireoidectomias realizadas por outros motivos e que não apresentassem tumores múltiplos maiores de 1 cm, somados os respectivos diâmetros; características morfológicas de comportamento agressivo (extensão extratireoidiana, invasão vascular, variante células altas e/ou células *hobnail*); paciente com idade inferior a 19 anos e história familiar de câncer de tireoide.

Os autores de ambos os trabalhos apontam que a adoção do uso do termo “Microtumor Papilífero” pelos patologistas após avaliação dos espécimes cirúrgicos poderia resultar em menos estresse psicológico ao paciente e evitar tratamento excessivo de tumores indolentes. Esses foram de certa forma os mesmos desfechos almejados pela comunidade médica ao definir NIFTP (18).

5.2 Transição epitélio-mesênquima

A TEM é um processo dinâmico presente na progressão de vários tipos de carcinomas de diversos órgãos (128). Permite que as células adquiram plasticidade de células-tronco, maior motilidade, capacidade de invasão e resistência a drogas, algumas delas utilizadas em quimioterapia (129, 130). A ativação do processo de TEM está intimamente relacionada à progressão do carcinoma da tireoide, que inclui extensão extratireoidiana, metástase à distância e aumento da plasticidade das células cancerígenas (131).

As células neoplásicas submetidas a TEM frequentemente expressam marcadores mesenquimais de forma anormal e perdem, em certa medida, a expressão de moléculas de adesão (81). A TEM não é um evento biológico binário e, como esperado, as células do carcinoma raramente adquirem um fenótipo mesenquimal completo e sim exibem expressão heterogênea de marcadores epiteliais e mesenquimais (128).

A perda de polaridade e de coesividade celular são características morfológicas observadas em células neoplásicas submetidas a TEM e são o resultado da perda de expressão de moléculas de adesão como E-caderina e β -catenina (83). Em tumores primários, tais características morfológicas são mais comumente vistas no fronte de invasão (81).

No presente estudo, para melhor entender o papel potencial da TEM no processo de invasão da cápsula nas neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero, a expressão imuno-histoquímica de marcadores relacionados à TEM nas células epiteliais neoplásicas foi descrita qualitativamente e semiquantificada em cada um dos três diferentes compartimentos de cada tumor, com base no conhecimento já disponível da heterogeneidade intratumoral em carcinomas sólidos (132). A heterogeneidade nos tumores da tireoide foi bem demonstrada em carcinomas papilíferos pouco diferenciados e anaplásicos, mas, mesmo trabalhos recentes reconhecem a necessidade de mais estudos sobre as características da TEM em carcinomas de tireoide em estágio inicial (133).

Observamos em nosso trabalho que as células neoplásicas mantiveram características imuno-histoquímicas fenotipicamente epiteliais tanto nas regiões centrais quanto nas periféricas não invasivas dos nódulos aqui estudados. Por outro lado, as células do fronte de invasão da cápsula tumoral apresentaram menor expressão imuno-histoquímica normal em membrana de E-caderina e β -catenina, enquanto mostraram ganho da expressão citoplasmática difusa (“padrão mesenquimal”) da Vimentina e ganho do padrão anômalo citoplasmático de expressão de β -catenina. Esses achados ocorreram tanto em tumores papilares quanto foliculares. Destaque-se, entretanto, que em nosso estudo, o fenômeno da TEM no fronte de invasão foi observado com mais

frequência em tumores com mais de 50% de formação papilar, muito provavelmente porque foi o padrão arquitetural que mais infiltrou a cápsula.

Resultados muito semelhantes foram observados por de Liu *et al.* (134) no fronte de invasão de carcinomas papilíferos da tireoide francamente invasivos. Vale ressaltar que a marcação nuclear aberrante da β -catenina, descrita como uma característica ocasional de carcinomas de tireoide pouco diferenciados (91), não foi observada no nosso trabalho, tendo sido considerada um marcador de fenótipo mais agressivo em neoplasia de tireoide, correlacionando-se com características clínico-patológicas adversas (96).

O padrão de expressão imuno-histoquímica dos marcadores da TEM aqui observados corrobora a hipótese de que existem diferentes fatores atuando em diferentes partes de cada neoplasia. No presente estudo, reforçamos que a capacidade de invasão da cápsula tumoral está morfológicamente relacionada com a expressão local de marcadores de TEM, esta ocorrendo principalmente nas áreas de cápsula mais espessa.

Vasko *et al.* (135) estudaram as diferenças na expressão de proteínas relacionadas à TEM entre os compartimentos centrais e periféricos (fronte) do carcinoma papilífero da tireoide francamente infiltrativo em nível molecular e também encontraram diminuição da expressão de genes relacionados à adesão celular e aumento da expressão de genes envolvidos no processo de TEM no fronte de invasão.

Dentre os marcadores imuno-histoquímicos estudados, a Vimentina foi a que melhor caracterizou isoladamente a ocorrência do fenômeno de TEM no fronte de invasão, tanto quando consideramos o ganho da expressão citoplasmática difusa (“padrão mesenquimal”) (presente em 7 dos 69 casos que infiltraram a cápsula), como quando avaliamos a redução da porcentagem de expressão do padrão citoplasmático basal (“padrão epitelial”) nesta região (presente em 9 dos 69 casos com infiltração da cápsula). Isso porque a Vimentina mostrou associação com as variáveis histológicas de forma semelhante à expressão conjunta de todos os demais marcadores. Ou seja, os casos que apresentaram o fenômeno de TEM pela marcação da Vimentina exibiram cápsula significativamente mais espessa e maior frequência de padrão arquitetural puramente papilar.

A Vimentina é um filamento intermediário que na célula mesenquimal fornece principalmente resistência celular ao estresse e à compressão. Uma célula para migrar precisa se adaptar à compressão e ao alongamento durante a invasão do tecido e tensão de cisalhamento pela corrente sanguínea. As células de carcinoma ao expressarem Vimentina adquirem essas características (136), que estão intimamente associadas com a ocorrência de metástase. Como destacado em excelente revisão recente por Kuburich *et al.* (137), do *MD Anderson Cancer Center*, o processo de TEM é dinâmico, em que nas fases iniciais as células neoplásicas expressam Citoqueratina e não expressam Vimentina. Com a progressão da doença, marcadores mesenquimais como a Vimentina passam a ser expressos, gerando uma população “Híbrida” de células neoplásicas, nas quais a Vimentina provavelmente funciona como estrutura dominante de sinalização associada a TEM. A interação entre os dois filamentos nesta população provavelmente fornece algumas propriedades benéficas às células cancerígenas durante a disseminação e invasão. No final do processo, os marcadores epiteliais são perdidos e as células apresentam fenótipo mesenquimal. O padrão único de regulação positiva da Vimentina que ocorre durante a TEM nas células epiteliais sugere que interferir na sua função pode se tornar uma estratégia terapêutica potencial para bloquear a progressão da doença.

Neste contexto, a caracterização da alteração de padrão de marcação da Vimentina no fronte de invasão da cápsula dos carcinomas papilíferos encapsulados da tireoide (seja clássico ou folicular invasivo) pode ser um achado importante na prática clínica, caso confirmado por outros estudos, contribuindo na avaliação prognóstica destes tumores.

No presente estudo, a pesquisa dos fatores de transcrição ZEB-1 e ZEB-2 nas células epiteliais resultou negativa. No entanto, observamos que estes marcadores foram expressos nas células tumorais estromais. Como muitos de nossos casos são de tumores pequenos e/ou pouco invasivos, tais achados levantam a hipótese de que a ativação de ZEB-1 e ZEB-2 nas células epiteliais submetidas a TEM pode ser um evento tardio na progressão dessas neoplasias. Padrão de marcação semelhante foi descrito em tumores em outros órgãos. Singh *et al.* (138) em 2008, por exemplo, observaram que a expressão

de ZEB-1 nas células estromais de carcinomas endometriais foi significativamente maior quando comparada às células estromais em endométrio hiperplásico ou em endométrio normal. Bronsert *et al.* (103) estudaram a expressão de ZEB-1 em adenocarcinomas ductais pancreáticos e observaram que a expressão nuclear em fibroblastos estromais era mais frequente do que em células epiteliais, ambos considerados marcadores de mau prognóstico.

O papel dos fibroblastos associados ao câncer na progressão dos tumores parece ser multifacetado (139). Dados da literatura sugerem que fatores de transcrição, incluindo ZEB-1 e ZEB-2, são necessários para a sinalização extracelular, permitindo assim o remodelamento da matriz extracelular. Essas alterações no microambiente tumoral podem induzir a expressão de fatores de transcrição nas células epiteliais tumorais adjacentes, conferindo-lhes maior motilidade e capacidade de invasão e metástase (140).

Um achado inesperado foi a identificação de uma porcentagem menor de células estromais tumorais que expressaram ZEB-1 e 2 no fronte de invasão capsular quando comparada com as regiões centrais e periféricas não invasivas do mesmo tumor. Isso pode ser uma indicação de que depois que as células epiteliais são iniciadas no processo de TEM, a expressão de fatores de transcrição em um grande número de células do estroma tumoral não seja mais necessária. Por outro lado, em regiões onde as células neoplásicas mantêm características fenotipicamente epiteliais, como nas regiões centrais e periféricas não invasivas dos tumores estudados, as células estromais podem permanecer ativadas em maior extensão. Porém, essa diferença de porcentagem de expressão não foi observada nas neoplasias puramente foliculares, o que pode sugerir que tumores com arquitetura folicular podem necessitar de maior ativação das células estromais para iniciar o processo de TEM no fronte de invasão da cápsula. Infelizmente, não foi possível chegar a uma conclusão mais incisiva devido ao número relativamente pequeno de casos aqui estudados. Novos estudos em peças cirúrgicas, bem como em condições experimentais, devem ser realizados para melhor compreensão desse aparente paradoxo.

Observamos então que o processo de TEM está presente apenas em células epiteliais no fronte de invasão da cápsula tumoral, demonstrando diferenças entre compartimentos do mesmo tumor, e isso parece ser

independente do padrão arquitetural das neoplasias. A participação da Vimentina neste processo, com os padrões de reatividade que aqui realçamos, poderá ser útil como biomarcador de possível interesse terapêutico como recentemente sugerido por Kuburich *et al.*, em 2022 (137).

5.3 Características moleculares

As mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS* são as mais frequentes no carcinoma papilífero da tireoide e são mutuamente exclusivas (73). No presente estudo, avaliamos as mutações mais comumente encontradas nas neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero: *BRAF*^{V600E} e *NRAS*^{Q61R}.

Resultados do estudo genômico como parte do *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Project* mostraram uma grande correlação genotípica-fenotípica nos carcinomas papilíferos da tireoide. Observou-se que a diminuição da formação de papilas e o aumento da formação de folículos acompanhado do aparecimento de cápsula tumoral bem definida correlaciona-se com a mudança de perfil de mutação no *BRAF*^{V600E} para uma assinatura molecular semelhante a *RAS*. Dessa forma, dois grupos principais de carcinomas papilíferos foram caracterizados, denominados *BRAF*^{V600E}(*BVL*)-like e *RAS*-like, nos quais os *BVL*-like apresentaram histologia clássica ou de células altas (variantes com arquitetura verdadeiramente papilífera), enquanto os tumores *RAS*-like estavam associados a variante folicular. Ficou, então, demonstrado que os carcinomas papilíferos da tireoide com arquitetura papilífera são histologicamente e molecularmente diferentes daqueles com arquitetura folicular (141-143).

Na nossa casuística observamos pelo sequenciamento de Sanger a ocorrência da mutação *BRAF*^{V600E} em 51,3% dos casos, semelhante ao descrito na literatura para o subtipo clássico do carcinoma papilífero (cerca de 60%) (64, 65). Comparativamente, em dois trabalhos publicados em 2021 que abordaram especificamente carcinomas papilíferos encapsulados da tireoide a ocorrência desta mutação foi muito variável, fato que pode ser reflexo do padrão histológico das neoplasias encapsuladas avaliadas. Giani *et al.* (118) identificaram a ocorrência de mutação *BRAF*^{V600E} em 15,4% dos casos estudados que eram formados em sua maior parte por neoplasias encapsuladas de padrão folicular

(cerca de 70% dos casos). Já no trabalho de Akbulut *et al.* esta mutação foi observada em 81,4% das neoplasias encapsuladas estudadas, todas elas apresentando formação de papilas (114). Na nossa casuística as neoplasias puramente foliculares compreenderam 30% dos casos estudados.

A mutação *NRAS*^{Q61R} foi identificada em 4 dos nossos casos (4,9%), três deles de padrão folicular e um com formação de papilas. Esta é a mutação mais frequente no gene *RAS* e é observada principalmente nos carcinomas papilíferos variante folicular encapsulada invasiva e no NIFTP, com prevalência descrita na literatura de cerca de 10 e 30% respectivamente, podendo também ser encontrada em adenomas foliculares e carcinomas foliculares da tireoide (144, 145).

A análise das mutações no contexto histológico mostrou na nossa casuística maior frequência da mutação *BRAF*^{V600E} nas neoplasias com maior porcentagem de formação de papilas (em sua maioria com mais de 50% de formação de papilar). Merece destaque o fato de nenhum dos 12 casos sequenciados classificados como NIFTP ter apresentado mutação para *BRAF*^{V600E}, sendo que 2 deles apresentaram mutação *NRAS*^{Q61R}.

Resultados semelhantes foram observados por outros autores. Cho *et al.* (119) mostraram que carcinomas papilíferos encapsulados não invasivos com formação exclusiva de folículos não apresentaram mutação *BRAF*^{V600E}, sendo esta observada nas neoplasias com menos de 1% de formação de papilas. Adicionalmente, Xu *et al.* (106) relataram que o aumento da porcentagem de formação de papilas nos carcinomas papilíferos encapsulados esteve associada à maior presença de mutação *BRAF*^{V600E}, sendo 10% de papilas aparentemente o valor de transição entre a presença da mutação *NRAS*^{Q61R} para a mutação *BRAF*^{V600E}, independente da infiltração da cápsula.

Outros artigos também mostraram ausência de mutação *BRAF*^{V600E} no NIFTP e maior prevalência da mutação *NRAS* nestes tumores (111, 144, 146). Nossos achados são, portanto, concordantes com a proposta da classificação da OMS 2022 de excluir o diagnóstico de NIFTP nos casos que apresentem mutação *BRAF*^{V600E} (3).

Vale ressaltar que a mutação *BRAF*^{K601E}, segunda mutação mais comum no gene *BRAF*, também pode ser encontrada no NIFTP, assim como nos

carcinomas foliculares da tireoide (147, 148). Tais neoplasias têm um potencial oncogênico menor e apresentam uma assinatura molecular semelhante a *RAS* (143). Essa mutação não foi especificamente pesquisada em nosso trabalho.

Apenas três dos nossos casos com padrão puramente folicular apresentaram mutação *BRAF*^{V600E}, todos com infiltração da cápsula e um deles com invasão vascular venosa e metástase linfonodal concomitantes. Este achado foi concordante com o descrito em trabalhos de Paniza *et al.* (146) e Sohn *et al.* (149), nos quais a mutação *BRAF*^{V600E} foi encontrada apenas nos carcinomas papilíferos variante folicular que apresentaram invasão, ou seja, no carcinoma papilífero variante folicular encapsulada invasivo e no carcinoma papilífero variante folicular infiltrativo, sendo este último descrito na literatura como molecularmente mais próximo aos carcinomas papilíferos clássicos (*BVL-like*) (67, 143, 150, 151).

Alguns estudos abordando o significado biológico destas mutações mostram que a mutação *BRAF*^{V600E} é um evento precoce na tumorigênese e é capaz de induzir perda de diferenciação, promover invasão e progressão da doença, configurando um pior prognóstico (68, 152).

Na nossa casuística observamos que os tumores com esta mutação tiveram maior frequência de invasão da cápsula tumoral. Por outro lado, parte das neoplasias com cápsula íntegra aqui estudadas também apresentaram mutação *BRAF*^{V600E} (7 casos), apesar de histologicamente estes tumores não terem evidenciado invasão vascular ou metástase linfonodal. Todos esses casos mostraram formação de papilas e eram em sua maioria subcentimétricos (85,7%, 6 casos).

Diante do fato de a mutação *BRAF*^{V600E} ter conferido maior capacidade de infiltração da cápsula no nosso trabalho, levanta-se então a questão se essas neoplasias predominantemente subcentimétricas e com cápsula íntegra teriam com o passar do tempo maior chance de invadir a cápsula do que aquelas sem esta mutação.

De fato, a prevalência da mutação *BRAF*^{V600E} é alta nos microcarcinomas e a sua importância prognóstica é controversa na literatura, já que são tumores que em sua maior parte têm excelente prognóstico a longo prazo (109). Em nosso trabalho, a mutação *BRAF*^{V600E} foi identificada em 71,8% das neoplasias

menores ou iguais a 10,0 mm, corroborando o conceito de que esta mutação ocorre precocemente nestas neoplasias.

Um debate muito atual diz respeito à eventual validade da inclusão da avaliação do status da mutação *BRAF*^{V600E} na estratificação de risco dos microcarcinomas papilíferos da tireoide, principalmente nos casos candidatos a vigilância ativa ao invés da ressecção cirúrgica (153, 154). Kim *et al.* (153) mostraram que esta mutação poderia definir isoladamente um risco significativamente aumentado de recorrência da doença em tumores de baixo risco comparado aos tumores sem esta mutação. A constatação de que esses tumores têm um potencial agressivo, podendo com o tempo, se não cirurgicamente tratados, adquirir características adversas como aumento de tamanho, extensão extratireoidiana e metástase linfonodal levou aqueles autores a propor que tais casos devam ser operados, restringindo então a conduta conservadora, com vigilância ativa, aos microcarcinomas de baixo risco sem evidências de mutação *BRAF*^{V600E}.

Estudos mostraram associação da mutação *BRAF*^{V600E} com invasão extratireoidiana, multifocalidade, metástase linfonodal e estágios avançados da doença, sugerindo este ser um marcador de risco para aumento da agressividade também em microcarcinomas (155, 156). A forte semelhança de características microscópicas entre microcarcinomas com mutação *BRAF*^{V600E} e carcinomas maiores de 10,0 mm com esta mutação suporta a hipótese de que eles pertencem biologicamente à mesma classe e que a mutação induz o mesmo conjunto de alterações morfológicas, independentemente do tamanho do tumor (157).

Por outro lado, observamos no nosso trabalho que as neoplasias sem mutação *BRAF*^{V600E} mostraram menor frequência de metástase linfonodal. Diante disso, acreditamos que as neoplasias encapsuladas com padrão arquitetural papilar, sem mutação no gene *BRAF*^{V600E}, sem invasão vascular e sem infiltração da cápsula possam ter prognóstico favorável, semelhante ao NIFTP. Giani *et al.* (118) e Rosario (158) em trabalhos também com casuísticas pequenas observaram estes mesmos achados. Sendo assim, caso novos estudos com séries maiores de casos histologicamente semelhantes e acompanhados clinicamente por longo período confirmem nossa hipótese, a

classificação de neoplasias encapsuladas de baixo risco da tireoide possa incluir também as neoplasias com arquitetura papilar, que atualmente são classificadas como carcinoma papilífero clássico encapsulado.

A Associação Americana de Tireoide ainda não definiu especificamente mutação *BRAF^{V600E}* como um fator isolado de estratificação de risco para microcarcinoma, considerando os tumores sem outras características de pior prognóstico (extensão extratireoidiana, histologia agressiva, invasão vascular ou metástases linfonodais) como de baixo risco, independente do status mutacional. No entanto, para carcinomas papilíferos medindo entre 10 e 40,0 mm, esta mutação é considerada prognóstica, sendo os tumores mutados e sem outras características de agressividade classificados como de risco intermediário (30).

No nosso trabalho observamos uma tendência de ocorrência de TEM nas neoplasias com mutação no *BRAF^{V600E}*. A possibilidade desta associação foi evidenciada em alguns trabalhos experimentais. Knauf *et al.* (159), em 2011 mostraram que, em carcinomas papilíferos da tireoide com mutação *BRAF^{V600E}* induzidos em camundongos, esta mutação torna as células neoplásicas suscetíveis à TEM através de um processo dependente de MAPK. Adicionalmente, Baquero *et al.* (160) observaram em cultura de células de carcinoma de tireoide (sem especificação do subtipo) que a mutação *BRAF^{V600E}* regula a expressão de genes envolvidos na TEM e aumenta a expressão da proteína *Snail*, que por sua vez, promove a regulação negativa da expressão da E-caderina. Por outro lado, poucos trabalhos com espécimes de pacientes foram realizados e até o momento ainda não foi confirmada essa associação (84, 161).

A avaliação conjunta das características histológicas e perfil molecular das neoplasias tireoidianas permite a obtenção de informações importantes para a estratificação de risco dos pacientes e para orientar decisões de manejo pós-cirúrgico adequado. Nesse contexto, a identificação de mutações somáticas nas neoplasias tem se tornado cada vez mais necessária.

O sequenciamento genético é considerado o padrão ouro para identificação de mutações somáticas (61) e diversos métodos baseados em PCR são utilizados para este fim, como sequenciamento de Sanger, PCR em tempo real, pirosequenciamento, sequenciamento de próxima geração, dentre outros.

Na prática diária essa avaliação mutacional é realizada principalmente através da extração de DNA a partir de tecido emblocado em parafina.

O sequenciamento de Sanger é o método mais comumente usado para detecção de mutações pontuais na pesquisa clínica (162) e também o mais escolhido como teste confirmatório de novas variantes identificadas pelo sequenciamento de próxima geração (163). É ferramenta bem estabelecida e confiável, que apresenta limite de detecção de no mínimo 6,6% de alelos mutados em amostras de neoplasias fixadas em formol e processadas em parafina (164). Já o sequenciamento de próxima geração é uma tecnologia mais moderna que permite a avaliação simultânea de muitos genes e a geração de milhões de sequências curtas de ácidos nucleicos em paralelo (165). Como no nosso trabalho o objetivo foi a pesquisa de apenas duas mutações pontuais e tínhamos uma casuística relativamente pequena, optamos por utilizar o método de Sanger, técnica já amplamente utilizada e padronizada no laboratório As Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP onde as reações foram realizadas.

É sabido que as análises baseadas em PCR de DNA isolado podem ser prejudicadas devido ao comprometimento da qualidade do DNA extraído de material parafinado (166). A macrodissecção é realizada nesses materiais para garantir maior pureza e concentração do DNA tumoral extraído (167). Esse procedimento foi feito em 45 casos (55,5% dos nossos casos) sequenciados na tentativa de melhorar a qualidade do DNA submetido à PCR, otimizando a sensibilidade obtida pelo sequenciamento de Sanger.

O exame imuno-histoquímico para detecção da proteína mutada tem sido descrito em alguns artigos como um método alternativo de pesquisa muito interessante para as amostras anatomopatológicas, permitindo identificar a distribuição das células mutadas no corte histológico. Os clones VE1 (168) e SP174 (62), utilizados para detecção das proteínas mutadas *BRAF*^{V600E} e *NRAS*^{Q61R} respectivamente, foram descritos como de sensibilidade e especificidade potencialmente alta (169). Em comparação ao sequenciamento, a sensibilidade do exame imuno-histoquímico para a detecção da proteína mutada *BRAF*^{V600E} descrita na literatura varia de 89% a 100% e a especificidade de 61,5% a 100% nos carcinomas papilíferos da tireoide (61, 168, 170-172). Já

para a identificação da proteína mutada *NRAS*^{Q61R}, os estudos são mais recentes e menos numerosos, com a sensibilidade relatada entre 90 e 100% e especificidade entre 76,6 e 100% (62, 173-175).

O exame imuno-histoquímico é amplamente utilizado em laboratórios de anatomia patológica e, comparado com técnicas moleculares, fornece resultados em menos tempo e é potencialmente mais barato. Mostrou-se na maioria dos estudos ser uma técnica mais sensível quando diante de blocos de parafina com tumores muito pequenos, fibrosos ou calcificados, situações em que a quantidade de DNA extraído pode ser insuficiente para amplificação, ocasionando resultados falso negativos no sequenciamento (162).

No nosso trabalho observamos sensibilidade de detecção da proteína mutada *BRAF*^{V600E} de 42,5% e especificidade de 100% em relação ao sequenciamento de Sanger. De outra parte, a pesquisa imuno-histoquímica de *NRAS*^{Q61R} não identificou nenhum dos 4 casos que mostraram positividade para esta mutação no sequenciamento de Sanger (sensibilidade de 0%).

A menor sensibilidade do exame imuno-histoquímico aqui observada para detecção mutacional em relação ao descrito na literatura poderia ser justificada pelo fato de o sequenciamento ter identificado tumores com pequena quantidade de alelos mutados que, possivelmente, não apresentaram expressão proteica suficiente para detecção ao exame imuno-histoquímico. Um fator chave para isso ter podido acontecer foi a realização da macrodissecção em mais da metade dos casos estudados.

A ausência de padronização na interpretação da marcação imuno-histoquímica destes anticorpos na literatura é um outro importante fator para ser assinalado. Alguns artigos consideram como reação positiva qualquer marcação com intensidade moderada a forte, enquanto a grande maioria considera apenas a marcação forte e difusa (172). O próprio protocolo de interpretação de resultados de testes moleculares para carcinoma de tireoide formulado pelo Colégio Americano de Patologistas não especifica os critérios interpretativos de positividade da reação imuno-histoquímica para pesquisa de mutação *BRAF*^{V600E} e *NRAS*^{Q61R} e também não uniformiza as condições analíticas e pré-analíticas necessárias para manejo nos laboratórios de patologia cirúrgica (176). Este fato pode gerar uma grande discrepância interpretativa em casos heterogêneos,

ocasionando em resultados falso negativos no exame imuno-histoquímico (59). Aqui em nosso trabalho consideramos a marcação forte (focal ou difusa) como positiva para ambos os anticorpos e utilizamos as padronizações do fabricante para realização da reação.

A pesquisa do status mutacional do gene *BRAF*, e potencialmente de outras mutações, ainda não é rotineiramente recomendada para a estratificação de risco pós-operatório inicial nos carcinomas bem diferenciados de tireoide, porém tem o potencial de refinar as estimativas de risco quando interpretado no contexto de outros fatores clínico-patológicos (30).

O exame imuno-histoquímico é método recomendado pela OMS como ferramenta de triagem na identificação de mutações genéticas específicas em carcinomas papilíferos da tireoide (109). Porém, tendo em vista a sensibilidade variável descrita na literatura para um mesmo clone utilizado e a falta de protocolos de padronização na interpretação dos resultados, entendemos que nossos resultados tornam necessária a análise técnica dos condicionantes pré-analíticos, principalmente relacionados à fixação, visando a viabilizar o uso da imuno-histoquímica a amostras de patologia cirúrgica. Enquanto não for validado um teste com maior sensibilidade, parece-nos prudente recomendar que a pesquisa de status mutacional de *BRAF* e *NRAS* seja feita por sequenciamento genético.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo de neoplasias encapsuladas da tireoide com características nucleares de carcinoma papilífero permitiu as seguintes conclusões:

1. Aspectos histopatológicos de maior destaque: cápsula tumoral e arquitetura papilar:
 - A. A cápsula fibrosa mostrou-se como uma barreira entre a neoplasia e o parênquima tireoidiano adjacente. A infiltração da cápsula tumoral foi pré-requisito para a ocorrência de invasão neoplásica vascular, tanto de vasos da cápsula como aqueles situados no parênquima adjacente, assim como de metástase linfonodal. Apenas quando infiltrada, a cápsula apresentou áreas de maior espessamento e as neoplasias maiores que 10 mm apresentaram mais frequentemente cápsula mais espessa.
 - B. O padrão arquitetural com identificação de papilas foi a principal característica anatomopatológica associada à infiltração da cápsula. Tumores com mais de 50% de formação de papilas apresentaram maior frequência de infiltração da cápsula, assim como maior tendência à metástase linfonodal. Por outro lado, a ocorrência de invasão vascular venosa foi mais observada nos tumores com menos de 50% de formação de papilas, principalmente puramente foliculares, aproximando estas neoplasias morfológicamente ao carcinoma folicular da tireoide.
 - C. Nos nódulos em que a cápsula tumoral permaneceu intacta, tanto aqueles diagnosticados como “puramente foliculares /NIFTP” como os com arquitetura papilar, a cápsula apresentou espessura mais delgada e características histológicas desfavoráveis (invasão vascular e metástase linfonodal) não foram evidenciadas.

Estes achados corroboram a recomendação prática de avaliação histológica cautelosa de toda a cápsula tumoral nas neoplasias encapsuladas,

principalmente das áreas mais espessas, para a detecção de focos de infiltração capsular, essencial definidor histológico de malignidade.

2. Aspectos imuno-histoquímicos relacionados à transição epitélio-mesênquima:
 - A. A capacidade das células neoplásicas de invadir a cápsula tumoral mostrou-se morfológicamente relacionada com a expressão local de marcadores de TEM, evidenciada principalmente nas áreas de cápsula mais espessa.
 - B. A TEM mostrou-se relevante no fronte de invasão da cápsula, não tendo sido encontradas evidências morfológicas ou imuno-histoquímicas de sua presença nos compartimentos centrais ou na região periférica de neoplasias não invasivas.
 - C. A TEM foi aqui evidenciada pela perda de expressão normal em membrana da E-caderina e β -catenina, alteração do padrão de expressão da β -catenina (ganho do padrão anômalo citoplasmático) e, principalmente, pela exuberante alteração do padrão de Vimentina (ganho da expressão citoplasmática difusa - “padrão mesenquimal”).

Nossos achados apontam o estudo do padrão da reatividade da Vimentina como aquele que melhor caracterizou a ocorrência de TEM.

3. Pesquisa das mutações dos genes *BRAF*^{V600E} e *NRAS*^{Q61R} no contexto histopatológico:
 - A. Nas condições em que foi executado nosso trabalho, o estudo das mutações dos genes *BRAF*^{V600E} e *NRAS*^{Q61R} por sequenciamento de Sanger mostrou-se superior à sua detecção pelo método imuno-histoquímico
 - B. A mutação no gene *BRAF* foi identificada principalmente nos tumores com mais de 50% de formação de papilas e naqueles com infiltração

da cápsula tumoral. O encontro da mutação no gene *BRAF* na maioria dos tumores subcentimétricos pode ser um indicador que esta seja desencadeadora de fenômenos iniciais no processo de carcinogênese, conferindo potencial mais agressivo a longo prazo

- C. Neoplasias sem mutação *BRAF*^{V600E} mostraram menor frequência de metástase linfonodal. Nenhum caso classificado histologicamente como NIFTP apresentou esta mutação no gene *BRAF*, sendo que dois deles mostraram a ocorrência de mutação no gene *NRAS*^{Q61R}.

O presente estudo destaca que, mesmo que apresentem formação de papilas, neoplasias encapsuladas sem mutação do *BRAF*, sem invasão vascular e sem infiltração da cápsula tumoral podem representar um subtipo de prognóstico favorável semelhante ao NIFTP.

Enfatizamos, por fim, que a avaliação combinada das características histológicas e do perfil molecular das neoplasias tireoidianas proporciona dados adicionais para a estratificação de risco dos pacientes, podendo vir a ser úteis na escolha de manejo pós-cirúrgico.

7 REFERÊNCIAS

1. Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J. Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. *Cancer*. 1985;55(4):805-28.
2. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th edition. ed: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
3. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Endocrine and neuroendocrine tumours [Internet]. 5th ed. ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022.
4. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, Barletta JA, Wenig BM, Al Ghuzlan A, Kakudo K, Giordano TJ, Alves VA, Khanafshar E, Asa SL, El-Naggar AK, Gooding WE, Hodak SP, Lloyd RV, Maytal G, Mete O, Nikiforova MN, Nosé V, Papotti M, Poller DN, Sadow PM, Tischler AS, Tuttle RM, Wall KB, LiVolsi VA, Randolph GW, Ghossein RA. Nomenclature revision for encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a paradigm shift to reduce overtreatment of indolent tumors. *JAMA Oncol*. 2016;2(8):1023-9.
5. Thompson LDR, Poller DN, Kakudo K, Burchette R, Nikiforov YE, Seethala RR. An International interobserver variability reporting of the nuclear scoring criteria to diagnose noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features: a validation study. *Endocr Pathol*. 2018;29(3):242-9.
6. Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL, Chan JK, DeLellis RA, Harach HR, Kakudo K, LiVolsi VA, Rosai J, Sebo TJ, Sobrinho-Simoes M, Wenig BM, Lae ME. Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(10):1336-40.
7. Alves VAF, Kakudo K, LiVolsi V, Lloyd RV, Nikiforov YE, Nosé V, Papotti M, Thompson LDR. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-

- like nuclear features (NIFTP): achieving better agreement by refining diagnostic criteria. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73:e576.
8. Fletcher CDM. *Diagnostic Histopathology of Tumours*. 4rd ed: Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2013.
 9. Yang J, Gong Y, Yan S, Shi Q, Zhu J, Li Z, Chen Q, Gong R. Comparison of the clinicopathological behavior of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma and classical papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(4):753-64.
 10. Chem KT, Rosai J. Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases. *Am J Surg Pathol*. 1977;1(2):123-30.
 11. Yu XM, Schneider DF, Levenson G, Chen H, Sippel RS. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma is a unique clinical entity: a population-based study of 10,740 cases. *Thyroid*. 2013;23(10):1263-8.
 12. LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol*. 2011;24 Suppl 2:S1-9.
 13. Vivero M, Kraft S, Barletta JA. Risk stratification of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2013;23(3):273-9.
 14. Xu B, Farhat N, Barletta JA, Hung YP, Biase D, Casadei GP, Onenerk AM, Tuttle RM, Roman BR, Katabi N, Nosé V, Sadow P, Tallini G, Faquin WC, Ghossein R. Should subcentimeter non-invasive encapsulated, follicular variant of papillary thyroid carcinoma be included in the noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features category? *Endocrine*. 2018 Jan;59(1):143-150.
 15. Gupta S, Ajise O, Dultz L, Wang B, Nonaka D, Ogilvie J, Heller KS, Patel KN. Follicular variant of papillary thyroid cancer: encapsulated, nonencapsulated, and diffuse: distinct biologic and clinical entities. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012 Mar;138(3):227-33.

16. Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LDR. Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of Thyroid. Second Edition ed: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 183-246.
17. Rosai R, DeLellis RA, Carcangiu ML, Frable W, Tallini GT. Tumors of the Thyroid and Parathyroid Glands. AFIP Atlas of Pathology. American Registry of Pathology.; 2014. p. 103-64.
18. Thompson LD. Ninety-four cases of encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a name change to noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features would help prevent overtreatment. *Mod Pathol.* 2016;29(7):698-707.
19. Nikiforov YE, Baloch ZW, Hodak SP, Giordano TJ, Lloyd RV, Seethala RR, Wenig BM. Change in diagnostic criteria for noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillarylike nuclear features. *JAMA Oncol.* 2018;4(8):1125-6.
20. Shafique K, LiVolsi VA, Montone K, Baloch ZW. Papillary Thyroid Microcarcinoma: Reclassification to non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP): a retrospective clinicopathologic study. *Endocr Pathol.* 2018;29(4):339-45.
21. Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, Fukushima M, Higashiyama T, Miya A. Overall survival of papillary thyroid carcinoma patients: a single-institution long-term follow-up of 5897 patients. *World J Surg.* 2018;42(3):615-22.
22. Lloyd RV, Osamura RY, Klèoppel G, Rosai J. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th edition. ed: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
23. Ito Y, Kudo T, Kihara M, Takamura Y, Kobayashi K, Miya A, Miyauchi A. Prognosis of low-risk papillary thyroid carcinoma patients: its relationship with the size of primary tumors. *Endocr J.* 2012;59(2):119-25.

24. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinoma: their implications for cancer staging. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(2):730-8.
25. Gardner RE, Tuttle RM, Burman KD, Haddady S, Truman C, Sparling YH, Wartofsky L, Sessions RB, Ringel MD. Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;126(3):309-12.
26. Falvo L, Catania A, D'Andrea V, Marzullo A, Giustiniani MC, De Antoni E. Prognostic importance of histologic vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Annals of Surgery*; 2005. p. 640–6.
27. Chan J. Tumors of the Thyroid and Parathyroid Glands. In: *Diagnostic Histopathology of Tumours* (Fletcher CDM. Ed.). 4rd ed: Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2013. p. 1177-272.
28. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald,JE, Compton CC, Hess R, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress D, Meyer LR. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed: Springer International Publishing; 2017.
29. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(7):716-9.
30. 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;26(1):1-133.

31. Adam MA, Pura J, Goffredo P, Dinan MA, Reed SD, Scheri RP, Hyslop T, Roman SA, Sosa JA. Presence and number of lymph node metastases are associated with compromised survival for patients younger than age 45 years with papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(21):2370-5.
32. Ghossein R, Ganly I, Biagini A, Robenshtok E, Rivera M, Tuttle RM. Prognostic factors in papillary microcarcinoma with emphasis on histologic subtyping: a clinicopathologic study of 148 cases. *Thyroid*. 2014;24(2):245-53.
33. Hoie J, Stenwig AE, Kullmann G, Lindegaard M. Distant metastases in papillary thyroid cancer. A review of 91 patients. *Cancer*. 1988;61(1):1-6.
34. Rosário PW, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, Maia AL, Vaisman M; Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013 Jun;57(4):240-64.
35. Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Staging systems for papillary thyroid carcinoma: a review and comparison. *Ann Surg*. 2007;245(3):366-78.
36. Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, Mayer M, Sylvester RJ, van Glabbeke M. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer (1965)*. 1979;15(8):1033-41.
37. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery*. 1987;102(6):1088-95.
38. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery*. 1993;114(6):1050-8.

39. MACIS Prognostic Score for Papillary Thyroid Carcinoma Calculator. <http://www.thyroid.org/thyroid-cancer-staging-calculator>.
40. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*. 1988;104(6):947-53.
41. Seethala RR, Baloch ZW, Barletta JA, Khanafshar E, Mete O, Sadow PM, LiVolsi VA, Nikiforov YE, Tallini G, Thompson LD. Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features: a review for pathologists. *Mod Pathol*. 2018;31(1):39-55.
42. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-49.
43. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021.
44. SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics [Internet]. Surveillance Research Program, National Cancer Institute; 2023 Apr 19.: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/>.
45. Kent WD, Hall SF, Isotalo PA, Houlden RL, George RL, Groome PA. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ*. 2007;177(11):1357-61.
46. Stančić J, Prpić M, Jukić T, Borić M, Kusić Z. Thyroid nodularity-true epidemic or improved diagnostics. *Acta Clin Croat*. 2009;48(4):413-8.
47. Li N, Du XL, Reitzel LR, Xu L, Sturgis EM. Impact of enhanced detection on the increase in thyroid cancer incidence in the United States: review of incidence trends by socioeconomic status within the surveillance, epidemiology, and end results registry, 1980-2008. *Thyroid*. 2013;23(1):103-10.

48. Jung CK, Little MP, Lubin JH, Brenner AV, Wells SA Jr, Sigurdson AJ, Nikiforov YE. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(2):E276-85.
49. Kitahara CM, Sosa JA. Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(11):617-8.
50. Wiltshire JJ, Drake TM, Uttley L, Balasubramanian SP. Systematic review of trends in the incidence rates of thyroid cancer. *Thyroid.* 2016;26(11):1541-52.
51. Hunt J. Radiation induced thyroid diseases. *AJSP: Reviews & Reports* 2009. p. 224-30.
52. Williams ED, Abrosimov A, Bogdanova T, Demidchik EP, Ito M, LiVolsi V, Lushnikov E, Rosai J, Tronko MD, Tsyb AF, Vowler SL, Thomas GA. Morphologic characteristics of Chernobyl-related childhood papillary thyroid carcinomas are independent of radiation exposure but vary with iodine intake. *Thyroid.* 2008;18(8):847-52.
53. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(4):286-95.
54. Feldt-Rasmussen U. Iodine and cancer. *Thyroid.* 2001;11(5):483-6.
55. 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.
56. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol.* 2008;21 Suppl 2:S37-43.
57. Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:102.

58. Koperek O, Kornauth C, Capper D, Berghoff AS, Asari R, Niederle B, von Deimling A, Birner P, Preusser M. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E-mutated protein in papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(6):844-50.
59. Na JI, Kim JH, Kim HJ, Kim HK, Moon KS, Lee JS, Lee JH, Lee KH, Park JT. VE1 immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in thyroid carcinoma: a review of its usefulness and limitations. *Virchows Arch.* 2015;467(2):155-68.
60. Colomba E, Hélias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, Surel S, Côté JF, Peschaud F, Capper D, Blons H, Zimmermann U, Clerici T, Saiag P, Emile JF. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. *J Mol Diagn.* 2013;15(1):94-100.
61. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, Pusch S, Mechtersheimer G, Zentgraf H, von Deimling A. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol.* 2011;122(1):11-9.
62. Oishi N, Kondo T, Vuong HG, Nakazawa T, Mochizuki K, Kasai K, Inoue T, Tahara I, Hirokawa M, Miyauchi A, Kato R. Immunohistochemical detection of NRAS(Q61R) protein in follicular-patterned thyroid tumors. *Hum Pathol.* 2016;53:51-7.
63. Bhaijee F, Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2011;22(3):126-33.
64. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*; 2005. p. 245-62.
65. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic

- characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(2):216-22.
66. Jakubowski M, Hunt JL. BRAF mutational analysis in papillary carcinomas with mixed follicular and papillary growth patterns. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(11):1590-3.
67. Rivera M, Ricarte-Filho J, Knauf J, Shaha A, Tuttle M, Fagin JA, Ghossein RA. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. *Mod Pathol*. 2010;23(9):1191-200.
68. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5399-404.
69. Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol*. 2011;24 Suppl 2:S34-43.
70. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6373-9.
71. Elisei R, Viola D, Torregrossa L, Giannini R, Romei C, Ugolini C, Molinaro E, Agate L, Biagini A, Lupi C, Valerio L, Materazzi G, Miccoli P, Piaggi P, Pinchera A, Vitti P, Basolo F. The BRAF(V600E) mutation is an independent, poor prognostic factor for the outcome of patients with low-risk intrathyroid papillary thyroid carcinoma: single-institution results from a large cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12):4390-8.

72. Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, Koizume S, Okamoto N, Kondo T, Masuda M, Miyagi Y. The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid*. 2012;22(7):683-9.
73. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(5):569-77.
74. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist*. 2013;18(8):926-32.
75. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, Yip L, Seethala RR, Tublin ME, Stang MT, Coyne C, Johnson JT, Stewart AF, Nikiforova MN. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):3390-7.
76. Khan MS, Qadri Q, Makhdoomi MJ, Wani MA, Malik AA, Niyaz M, Masoodi SR, Andrabi KI, Ahmad R, Mudassar S. RET/PTC Gene Rearrangements in Thyroid Carcinogenesis: Assessment and Clinico-Pathological Correlations. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(1):507-513.
77. Romei C, Ciampi R, Elisei R. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(4):192-202.
78. Colato C, Vicentini C, Cantara S, Pedron S, Brazzarola P, Marchetti I, Di Coscio G, Chilosi M, Brunelli M, Pacini F, Ferdeghini M. Break-apart interphase fluorescence in situ hybridization assay in papillary thyroid carcinoma: on the road to optimizing the cut-off level for RET/PTC rearrangements. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(5):571-82.
79. Boos LA, Dettmer M, Schmitt A, Rudolph T, Steinert H, Moch H, Sobrinho-Simões M, Komminoth P, Perren A. Diagnostic and prognostic implications

- of the PAX8-PPAR γ translocation in thyroid carcinomas-a TMA-based study of 226 cases. *Histopathology*. 2013;63(2):234-41.
80. Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, El-Naggar AK, Fredrick MJ, Cieply KM, Clayman GL. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(2):485-91.
 81. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
 82. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1429-37.
 83. Bai Y, Kakudo K, Nakamura M, Ozaki T, Li Y, Liu Z, Mori I, Miyauchi A, Zhou G. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma and periostin expression. *Cancer Lett*. 2009;281(2):188-95.
 84. Jung CW, Han KH, Seol H, Park S, Koh JS, Lee SS, Kim MJ, Choi IJ, Myung JK. Expression of cancer stem cell markers and epithelial-mesenchymal transition-related factors in anaplastic thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):560-8.
 85. Montemayor-Garcia C, Hardin H, Guo Z, Larrain C, Buehler D, Asioli S, Chen H, Lloyd RV. The role of epithelial mesenchymal transition markers in thyroid carcinoma progression. *Endocr Pathol*. 2013;24(4):206-12.
 86. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3756-88.
 87. Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer*. 2000;36(13 Spec No):1607-20.

88. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):151-66.
89. Dabbs D. *Diagnostic immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. 5 edition ed: Elsevier Inc; 2018.
90. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1198(1):11-26.
91. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol.* 2001;158(3):987-96.
92. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192-205.
93. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):118-32.
94. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1049-60.
95. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2017;8(20):33972-89.
96. Išić Denčić T, Bartolome A, Šelemetjev S, Đorić I, Tatić S, Živaljević V, Cvejić D. High expression and localization of β -catenin and epidermal growth factor receptor identify high risk papillary thyroid carcinoma patients. *Exp Mol Pathol.* 2018;105(2):181-9.
97. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal

- cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract.* 1998;194(10):701-4.
98. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(18):3033-46.
 99. Henzen-Logmans SC, Mullink H, Ramaekers FC, Tadema T, Meijer CJ. Expression of cytokeratins and vimentin in epithelial cells of normal and pathologic thyroid tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987;410(4):347-54.
 100. Guan H, Liang W, Xie Z, Li H, Liu J, Liu L, Xiu L, Li Y. Down-regulation of miR-144 promotes thyroid cancer cell invasion by targeting ZEB1 and ZEB2. *Endocrine.* 2015;48(2):566-74.
 101. Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle.* 2015;14(4):481-7.
 102. The Human Protein Atlas. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org>.
 103. Bronsert P, Kohler I, Timme S, Kiefer S, Werner M, Schilling O, Vashist Y, Makowiec F, Brabletz T, Hopt UT, Bausch D, Kulemann B, Keck T, Wellner UF. Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer. *Surgery.* 2014;156(1):97-108.
 104. Wong TS, Gao W, Chan JY. Transcription regulation of E-cadherin by zinc finger E-box binding homeobox proteins in solid tumors. *Biomed Res Int.* 2014;2014:921564.
 105. Zhang Y, Liu G, Wu S, Jiang F, Xie J, Wang Y. Zinc finger E-box-binding homeobox 1: its clinical significance and functional role in human thyroid cancer. *Onco Targets Ther.* 2016;9:1303-10.
 106. Xu B, Serrette R, Tuttle RM, Alzumaili B, Ganly I, Katabi N, Tallini G, Ghossein R. How many papillae in conventional papillary carcinoma? a

- clinical evidence-based pathology study of 235 unifocal encapsulated papillary thyroid carcinomas, with emphasis on the diagnosis of noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features. *Thyroid*. 2019;29(12):1792-803.
107. Isarangkul W. Dense fibrosis. Another diagnostic criterion for papillary thyroid carcinoma. 1993. p. 645-6.
 108. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hunt T. *Molecular biology of the cell* 6th edition ed: Garland Science; 2017.
 109. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, LiVolsi VA, Papotti MG, Sobrinho-Simões M, Tallini G, Mete O. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022;33(1):27-63.
 110. O'Neill CJ, Vaughan L, Learoyd DL, Sidhu SB, Delbridge LW, Sywak MS. Management of follicular thyroid carcinoma should be individualised based on degree of capsular and vascular invasion. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37(2):181-5.
 111. Baloch ZW, LiVolsi VA. Our approach to follicular-patterned lesions of the thyroid. *J Clin Pathol*. 2007;60(3):244-50.
 112. Zhu Y, Li Y, Jung CK, Song DE, Hang JF, Liu Z, Jain D, Lai CR, Hirokawa M, Kakudo K, Bychkov A. Histopathologic assessment of capsular invasion in follicular thyroid neoplasms-an observer variation study. *Endocr Pathol*. 2020;31(2):132-40.
 113. Mete O, Asa SL. Thyroid Tumor Capsular Invasion: the Bottom Line or Much Ado About Nothing? *Endocr Pathol*. 2020;31(2):141-2.
 114. Akbulut D, Kuz ED, Kursun N, Dizbay Sak S. Capsular invasion matters also in "papillary patterned" tumors: a study on 121 cases of encapsulated

- conventional variant of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol.* 2021;32(3):357-67.
115. Rivera M, Tuttle RM, Patel S, Shaha A, Shah JP, Ghossein RA. Encapsulated papillary thyroid carcinoma: a clinico-pathologic study of 106 cases with emphasis on its morphologic subtypes (histologic growth pattern). *Thyroid.* 2009;19(2):119-27.
 116. French B, Hattier G, Mardekian SK. Utility of tumor capsule thickness as a predictor of invasion in encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma and a diagnostic tool for noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features. *Int J Surg Pathol.* 2020;28(1):13-9.
 117. Baloch ZW, Shafique K, Flanagan M, Livolsi VA. Encapsulated classic and follicular variants of papillary thyroid carcinoma: comparative clinicopathologic study. *Endocr Pract.* 2010;16(6):952-9.
 118. Giani C, Torregrossa L, Ramone T, Romei C, Matrone A, Molinaro E, Agate L, Materazzi G, Piaggi P, Ugolini C, Basolo F, Ciampi R, Elisei R. Whole tumor capsule is prognostic of very good outcome in the classical variant of papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(10):e4072-e4083.
 119. Cho U, Mete O, Kim MH, Bae JS, Jung CK. Molecular correlates and rate of lymph node metastasis of non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features and invasive follicular variant papillary thyroid carcinoma: the impact of rigid criteria to distinguish non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features. *Mod Pathol.* 2017;30(6):810-25.
 120. Giani C, Torregrossa L, Piaggi P, Matrone A, Viola D, Molinaro E, Agate L, Romei C, Ugolini C, De Napoli L, Materazzi G, Basolo F, Elisei R. Outcome of classical (CVPTC) and follicular (FVPTC) variants of papillary thyroid cancer: 15 years of follow-up. *Endocrine.* 2020;68(3):607-16.

121. Ghossein R, Ganly I, Tuttle RM, Xu B. Large (>4 cm) Intrathyroidal encapsulated well-differentiated follicular cell-derived carcinoma without vascular invasion may have negligible risk of recurrence even when treated with lobectomy alone. *Thyroid*. 2023;33(5):586-92.
122. Du L, Wang Y, Sun X, Li H, Geng X, Ge M, Zhu Y. Thyroid cancer: trends in incidence, mortality and clinical-pathological patterns in Zhejiang Province, Southeast China. *BMC Cancer*. 2018;18(1):291.
123. Ito Y, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Kuma S, Kuma K, Miyauchi A. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid*. 2003;13(4):381-7.
124. Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, Higashiyama T, Kobayashi K, Miya A. Patient age is significantly related to the progression of papillary microcarcinoma of the thyroid under observation. *Thyroid*. 2014;24(1):27-34.
125. Sugitani I, Ito Y, Takeuchi D, Nakayama H, Masaki C, Shindo H, Teshima M, Horiguchi K, Yoshida Y, Kanai T, Hirokawa M, Hames KY, Tabei I, Miyauchi A. Indications and strategy for active surveillance of adult low-risk papillary thyroid microcarcinoma: Consensus Statements from the Japan Association of Endocrine Surgery Task Force on Management for Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Thyroid*. 2021;31(2):183-192.
126. Rosai J, LiVolsi VA, Sobrinho-Simoes M, Williams ED. Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. *Int J Surg Pathol*. 2003;11(4):249-51.
127. Aliyev E, Ladra-González MJ, Sánchez-Ares M, Abdulkader-Nallib I, Pisonera M, Rodríguez-Carnero G, Vieiro-Balo P, Pérez-Becerra R, Gude-Sampedro F, Barreiro-Morandeira F, Alvarez CV, Cameselle-Teijeiro JM. Thyroid papillary microtumor: validation of the (updated) porto proposal assessing sex hormone receptor expression and mutational BRAF gene status. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(9):1161-72.

128. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(2):69-84.
129. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29(34):4741-51.
130. Darvishi B, Eisavand MR, Majidzadeh-A K, Farahmand L. Matrix stiffening and acquired resistance to chemotherapy: concepts and clinical significance. *Br J Cancer.* 2022.
131. Shakib H, Rajabi S, Dehghan MH, Mashayekhi FJ, Safari-Alighiarloo N, Hedayati M. Epithelial-to-mesenchymal transition in thyroid cancer: a comprehensive review. *Endocrine.* 2019;66(3):435-55.
132. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
133. Fugazzola L, Muzza M, Pogliaghi G, Vitale M. Intratumoral Genetic Heterogeneity in Papillary Thyroid Cancer: Occurrence and Clinical Significance. *Cancers (Basel).* 2020;12(2).
134. Liu Z, Kakudo K, Bai Y, Li Y, Ozaki T, Miyauchi A, Taniguchi E, Mori I. Loss of cellular polarity/cohesiveness in the invasive front of papillary thyroid carcinoma, a novel predictor for lymph node metastasis; possible morphological indicator of epithelial mesenchymal transition. *J Clin Pathol.* 2011;64(4):325-9.
135. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, Ringel MD. *Gene*

- expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2803-8.
136. Mendez MG, Restle D, Janmey PA. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys J*. 2014;107(2):314-23.
 137. Kuburich NA, den Hollander P, Pietz JT, Mani SA. Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. *Semin Cancer Biol*. 2022;86(Pt 3):816-26.
 138. Singh M, Spoelstra NS, Jean A, Howe E, Torkko KC, Clark HR, Darling DS, Shroyer KR, Horwitz KB, Broaddus RR, Richer JK. ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Mod Pathol*. 2008;21(7):912-23.
 139. Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1-2):195-208.
 140. Baulida J. Epithelial-to-mesenchymal transition transcription factors in cancer-associated fibroblasts. *Mol Oncol*. 2017;11(7):847-59.
 141. Giordano TJ. Follicular cell thyroid neoplasia: insights from genomics and The Cancer Genome Atlas research network. *Curr Opin Oncol*. 2016;28(1):1-4.
 142. Network CGAR. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-90.
 143. Acquaviva G, Visani M, Repaci A, Rhoden KJ, de Biase D, Pession A, Giovanni T. Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology*. 2018;72(1):6-31.

144. Johnson DN, Furtado LV, Long BC, Zhen CJ, Wurst M, Mujacic I, Kadri S, Segal JP, Antic T, Cipriani NA. Noninvasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features are genetically and biologically similar to adenomatous nodules and distinct from papillary thyroid carcinomas with extensive follicular growth. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(7):838-50.
145. Marotta V, Bifulco M, Vitale M. Significance of RAS mutations in thyroid benign nodules and non-medullary thyroid cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(15).
146. Sohn SY, Lee JJ, Lee JH. Molecular Profile and Clinicopathologic Features of Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(2):927-36.
147. Afkhami M, Karunamurthy A, Chiosea S, Nikiforova MN, Seethala R, Nikiforov YE, Coyne C. Histopathologic and clinical characterization of thyroid tumors carrying the BRAF(K601E) mutation. *Thyroid.* 2016;26(2):242-7.
148. Taneja C, Yip L, Morariu EM, Seethala R, Chiosea SI, Ohori NP, Carty SE, Nikiforova MN, Nikiforov YE, Karslioglu-French E. Clinicopathologic characteristics and postsurgical follow-up of noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features in the postnomenclature revision era. *Thyroid.* 2022;32(11):1346-52.
149. Paniza ACJ, Mendes TB, Viana MDB, Thomaz DMD, Chiappini PBO, Colozza-Gama GA, Lindsey SC, de Carvalho MB, Alves VAF, Curioni O, Bastos AU, Cerutti JM. Revised criteria for diagnosis of NIFTP reveals a better correlation with tumor biological behavior. *Endocr Connect.* 2019;8(11):1529-38.
150. Howitt BE, Jia Y, Sholl LM, Barletta JA. Molecular alterations in partially-encapsulated or well-circumscribed follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2013;23(10):1256-62.

151. Tallini G, Tuttle RM, Ghossein RA. The History of the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(1):15-22.
152. de Biase D, Cesari V, Visani M, Casadei GP, Cremonini N, Gandolfi G, Sancisi V, Ragazzi M, Pession A, Ciarrocchi A, Tallini G. High-sensitivity *BRAF* mutation analysis: *BRAF V600E* is acquired early during tumor development but is heterogeneously distributed in a subset of papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(8):E1530-8.
153. Kim KJ, Kim SG, Tan J, Shen X, Viola D, Elisei R, Puxeddu E, Fugazzola L, Colombo C, Jarzab B, Czarniecka A, Lam AK, Mian C, Vianello F, Yip L, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, O'Neill CJ, Sywak MS, Clifton-Bligh R, Bendlova B, Sýkorová V, Xing M. *BRAF V600E* status may facilitate decision-making on active surveillance of low-risk papillary thyroid microcarcinoma. *Eur J Cancer.* 2020;124:161-9.
154. Xing M. Genetic-guided risk assessment and management of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019;48(1):109-24.
155. Ma YJ, Deng XL, Li HQ. *BRAF(V^{600E})* mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid microcarcinoma: A meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2015;35(4):591-9.
156. Li F, Chen G, Sheng C, Gusdon AM, Huang Y, Lv Z, Xu H, Xing M, Qu S. *BRAFV600E* mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(2):159-68.
157. Tallini G, de Biase D, Durante C, Acquaviva G, Bisceglia M, Bruno R, Bacchi Reggiani ML, Casadei GP, Costante G, Cremonini N, Lamartina L, Meringolo D, Nardi F, Pession A, Rhoden KJ, Ronga G, Torlontano M, Verrienti A, Visani M, Filetti S. *BRAF V600E* and risk stratification of thyroid microcarcinoma: a multicenter pathological and clinical study. *Mod Pathol.* 2015;28(10):1343-59.

158. Rosario PW. Noninvasive encapsulated papillary RAS-like thyroid tumor (NEPRAS) or encapsulated papillary thyroid carcinoma (PTC). *J Pathol Transl Med.* 2020;54(3):263-4.
159. Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, Lundsmith E, Ryder M, Salzano M, Nikiforov YE, Giordano TJ, Ghossein RA, Fagin JA. Progression of *BRAF*-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGF β signaling. *Oncogene.* 2011;30(28):3153-62.
160. Baquero P, Sánchez-Hernández I, Jiménez-Mora E, Orgaz JL, Jiménez B, Chiloeches A. (*V600E*) *BRAF* promotes invasiveness of thyroid cancer cells by decreasing E-cadherin expression through a Snail-dependent mechanism. *Cancer Lett.* 2013;335(1):232-41.
161. Baldini E, Tuccilli C, Pironi D, Catania A, Tartaglia F, Di Matteo FM, Palumbo P, Arcieri S, Mascagni D, Palazzini G, Tripodi D, Maturo A, Vergine M, Tarroni D, Lori E, Ferent IC, De Vito C, Fallahi P, Antonelli A, Censi S, D'Armiento M, Barollo S, Mian C, Morrone A, D'Andrea V, Sorrenti S, Ulisse S. Expression and clinical utility of transcription factors involved in epithelial-mesenchymal transition during thyroid cancer progression. *J Clin Med.* 2021;10(18):4076.
162. Kim JK, Seong CY, Bae IE, Yi JW, Yu HW, Kim SJ, Won JK, Chai YJ, Choi JY, Lee KE. Comparison of immunohistochemistry and direct sequencing methods for identification of the *BRAF*^{V600E} mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(6):1775-81.
163. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, Grody WW, Hegde MR, Hoeltge GA, Leonard DG, Merker JD, Nagarajan R, Palicki LA, Robetorye RS, Schrijver I, Weck KE, Voelkerding KV. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(4):481-93.

164. Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, Tietze L, Schildhaus HU, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E *BRAF* mutations. *BMC Cancer*. 2014;14:13.
165. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008;26(10):1135-45.
166. Colozza-Gama GA, Callegari F, Bešič N, Paniza ACJ, Cerutti JM. Machine learning algorithm improved automated droplet classification of ddPCR for detection of *BRAF V600E* in paraffin-embedded samples. *Sci Rep*. 2021;11(1):12648.
167. Wisner L, Larsen B, Maguire A. Enhancing tumor content through tumor macrodissection. *J Vis Exp*. 2022 ;(180):10.3791/62961.
168. Kakavand H, Walker E, Lum T, Wilmott JS, Selinger CI, Smith E, Saw RP, Yu B, Cooper WA, Long GV, O'Toole SA, Scolyer RA. *BRAF(V600E)* and *NRAS(Q61L/Q61R)* mutation analysis in metastatic melanoma using immunohistochemistry: a study of 754 cases highlighting potential pitfalls and guidelines for interpretation and reporting. *Histopathology*. 2016;69(4):680-6.
169. Zagzag J, Pollack A, Dultz L, Dhar S, Ogilvie JB, Heller KS, Deng FM, Patel KN. Clinical utility of immunohistochemistry for the detection of the *BRAF v600e* mutation in papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 2013;154(6):1199-205.
170. Routhier CA, Mochel MC, Lynch K, Dias-Santagata D, Louis DN, Hoang MP. Comparison of 2 monoclonal antibodies for immunohistochemical detection of *BRAF V600E* mutation in malignant melanoma, pulmonary carcinoma, gastrointestinal carcinoma, thyroid carcinoma, and gliomas. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2563-70.

171. Ghossein RA, Katabi N, Fagin JA. Immunohistochemical detection of mutated BRAF V600E supports the clonal origin of BRAF-induced thyroid cancers along the spectrum of disease progression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):E1414-21.
172. Chen D, Qi W, Zhang P, Zhang Y, Liu Y, Guan H, Wang L. Investigation of BRAF V600E detection approaches in papillary thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2018;214(2):303-307.
173. Dias-Santagata D, Su Y, Hoang MP. Immunohistochemical detection of NRASQ61R mutation in diverse tumor types. *Am J Clin Pathol.* 2016;145(1):29-34.
174. Crescenzi A, Fulciniti F, Bongiovanni M, Giovanella L, Trimboli P. Detecting N-RAS Q61R mutated thyroid neoplasias by immunohistochemistry. *Endocr Pathol.* 2017;28(1):71-4.
175. Saliba M, Katabi N, Dogan S, Xu B, Ghossein RA. NRAS Q61R immunohistochemical staining in thyroid pathology: sensitivity, specificity and utility. *Histopathology.* 2021;79(4):650-60.
176. College of American Pathologists, Cancer protocols templates - Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Thyroid Carcinoma. Disponível em: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates>.