

Análise imunoistoquímica do biomarcador Ciclina D1 nos carcinomas papilíferos de tireoide e bócios multinodulares

Immunohistochemical analysis of the Cyclin D1 biomarker in papilliferous thyroid carcinomas and multinodular goiters

Ivan José Paredes Bartolomei^{1,2}, Carmen Australia Paredes Marcondes Ribas¹, Maria Augusta Karas Zella³, Ana Maria Waaga-Gasser³, Martin Gasser⁴, Nicolau Gregori Czezko⁵, Paulo Afonso Nunes Nassif^{1,2}, Jose Eduardo Ferreira Manso⁴, Orlando Jorge Martins Torres⁵

RESUMO

Racional: Os carcinomas papilíferos são os mais prevalentes e menos agressivos de tireoide (CPT). Em alguns casos, o diagnóstico é duvidoso e o prognóstico ruim. A busca de biomarcadores teciduais que permitam assegurar tanto o diagnóstico para casos indeterminados, quanto o prognóstico, identificando os casos de maior agressividade, têm sido estudadas nas últimas décadas.

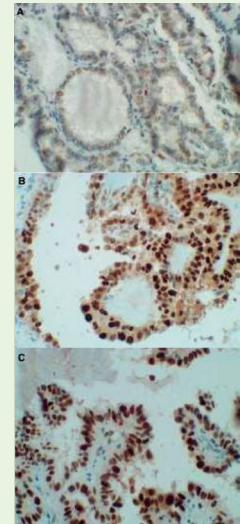
Objetivo: Analisar a ciclina D1 nos CPT e nos bóciós multinodulares (BMN) e verificar a correlação da marcação com as características clinicopatológicas.

Métodos: Foram selecionados 118 tecidos de pacientes adultos submetidos à tireoidectomia por CPT e 40 BMN como grupo controle. Realizou-se imunocoloração tecidual com ciclina D1 com subsequente análise imunoistoquímica em ambos grupos, avaliando-se a expressão do marcador (intensidade e distribuição). No grupo dos CPT os dados da imunocoloração foram também cruzados com os dados clinicopatológicos.

Resultados: A maioria (93,3%) expressou a coloração da ciclina D1 com intensidades variadas (fraca, moderada e forte) e distribuição predominantemente difusa (71,2%). O grupo controle dos BMN, expressou coloração para ciclina D1 em 57,5%, com intensidade fraca (47,5%) e distribuição esparsa (37,5%). A diferença entre os grupos (estudo e controle) foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). No grupo dos CPT, os cruzamentos clinicopatológicos não evidenciaram diferenças quanto à idade, sexo, tipo e tamanho tumoral, estado linfonodal, focalidade e invasão angiolinfática.

Conclusão: A ciclina D1 foi expressa na grande maioria dos CPT sendo a distribuição difusa predominante. Não houve correlação entre a expressão dela com qualquer característica clinicopatológica dos CPT.

DESCRITORES: Carcinomas papilíferos de tireoide. Ciclina D1. Imunoistoquímica. Diagnóstico. Prognóstico.



Coloração da ciclina D1: A) fraca ++/3; B) moderada ++/3; C) forte +++/

Mensagem Central

A busca de biomarcadores teciduais que permitam assegurar tanto o diagnóstico para casos indeterminados, quanto o prognóstico, identificando os casos de maior agressividade, têm sido estudadas nas últimas décadas e também no câncer da tireoide

Perspectiva

A expressão da ciclina D1 na diferenciação entre bóciós multinodulares e carcinomas papilíferos de tireoide mostrou-se útil principalmente se presente a coloração difusa. Este marcador molecular poderia ter papel diferenciador para o clínico e patologista em amostras adquiridas pela punção aspirativa por agulha fina para auxiliar no diagnóstico de carcinoma em nódulos com características indeterminadas.

ABSTRACT

Background: Papillary thyroid carcinomas (PTC) are the most prevalent and least aggressive thyroid carcinomas. In some cases, the diagnosis is doubtful and the prognosis is poor. The search for tissue biomarkers that make it possible to ensure both the diagnosis for indeterminate cases and the prognosis, identifying the most aggressive cases, has been studied in recent decades.

Objective: To analyze the molecular marker cyclin D1 in PTC and multinodular goiter (BMN) and to verify the correlation of the marking with the clinical-pathological characteristics in carcinomas.

Methods: 118 tissues from adult patients submitted to PTC thyroidectomy and 40 BMN were selected as a control group. Tissue immunostaining was performed with cyclin D1 with subsequent immunohistochemical analysis in both groups, evaluating the expression of the marker (intensity and distribution). In the PTC group, immunostaining data were also crossed with clinical and pathological data.

Results: The majority (93.3%) expressed the staining of cyclin D1 with varying intensities (weak, moderate and strong) and predominantly diffuse distribution (71.2%). The BMN control group expressed staining for cyclin D1 in 57.5%, with weak intensity (47.5%) and sparse distribution (37.5%). The difference between the groups (study and control) was statistically significant ($p < 0.001$). In the CPT group, the clinical-pathological crossings did not show differences regarding age, sex, tumor type and size, lymph node status, focus, angiolymphatic invasion.

Conclusion: Cyclin D1 was expressed in the vast majority of PTC with the predominant diffuse distribution. There was no correlation between the expression of cyclin D1 and any clinical-pathological characteristic of PTC.

KEYWORDS: Papillary thyroid carcinomas. Cyclin D1. Immunohistochemistry.

¹Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

²Hospital Universitário Evangélico Mackenzie, Curitiba, PR, Brasil

³Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Cirurgia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Medicina II, Centro de Ciências da Saúde, São Luis, MA, Brasil

Conflict of interest: None | Financial source: None | Received: 07/09/2023 | Accepted: 03/12/2023 | Correspondence: dr.ivan.paredes@gmail.com | Editor Associada: Nerlan Tadeu Gonçalves de Carvalho⁶

Como citar:

Bartolomei IJP, Ribas CAPM, Zella MAK, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Czezko NG, et al. Análise imunoistoquímica do biomarcador Ciclina D1 nos carcinomas papilíferos de tireoide e bóciós multinodulares. BioSCIENCE 2024;82:e00001

INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço e a neoplasia endócrina mais frequente. Predomina nas mulheres entre 45- 54 anos, e tem como principais fatores de risco o sexo feminino, a história familiar de câncer de tireoide e a exposição à radiação na região do pescoço. No Brasil, esse câncer corresponde a 1,3% de todos os cânceres, com incidência anual de 9.610 casos novos, 4% em mulheres e 0,7% em homens.¹ Os mais prevalentes são os papilíferos (80%) e foliculares (10%), denominados carcinomas diferenciados de tireoide. Já os carcinomas medulares e os anaplásicos, são chamados respectivamente de carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados, sendo menos frequentes e mais agressivos. Os carcinomas podem apresentar metástases para os linfonodos (papilíferos e medulares), metástases à distância (todos os tipos) e/ou invadir estruturas locais como nervo laríngeo recorrente, traqueia, músculo e/ou do esôfago (frequentemente nos anaplásicos).²

As causas e a fisiopatologia do câncer de tireoide não são bem compreendidas.^{3,4} Clinicamente eles manifestam-se predominantemente pelo aparecimento de nódulos na região da tireoide, menos frequentemente por surgimento de linfonodos na cadeia cervical, rouquidão, dispneia, disfagia ou tosse e raramente por metástases à distância (pulmonares e ósseas). Nos últimos anos, com o avanço da tecnologia, o achado incidental por exame de imagem (ultrassonografia, tomografia, ressonância ou PET-CT) tem sido cada vez mais frequente.⁵ Para o diagnóstico, na prática, utiliza-se a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), menos invasiva e geralmente efetiva. Porém, em certos casos podem ocorrer dificuldades na identificação do material como benigno ou maligno, conduzindo o paciente para a cirurgia.

Os marcadores tumorais vêm sendo utilizados há algumas décadas para minimizar a falta de acurácia diagnóstica e prognóstica dos carcinomas de tireoide. Por exemplo, no sangue, a presença da tireoglobulina se correlaciona com a persistência dos carcinomas diferenciados de tireoide pós-tireoidectomia; a calcitonina e o antígeno carcinoembrionário, com a massa tumoral dos carcinomas medulares. No tecido tumoral, o marcador genético BRAF-V600E correlaciona-se ao pior prognóstico nos papilíferos.^{2,6-10}

Para auxiliar a interpretação da citologia também têm sido utilizadas análises moleculares através da técnica imunoistoquímica nas amostras tumorais. Nessa direção está a ciclina D1, proteína responsável pelo controle e coordenação do ciclo celular. A desregulação desta proteína pode ocasionar sua superexpressão, afetando o controle do ciclo celular, contribuindo para a tumorigênese.^{11,12}

Os objetivos deste estudo foram analisar a presença do marcador molecular ciclina D1 nos carcinomas papilíferos de tireoide e nos bócios multinodulares, e avaliar se a expressão da ciclina D1 apresenta correlação com as características clinicopatológicas dos carcinomas papilíferos da glândula.

MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná (FEMPAR), Curitiba, PR, Brasil, em parceria com Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School Molecular Oncology and Immunology and Renal Division, Boston, MA. USA. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, sob parecer CAEE 66383317.7.0000.0103, estando de acordo com os preceitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS).

A pesquisa foi realizada entre janeiro de 2017 e dezembro de 2018 em três hospitais-escola Hospital Universitário Evangélico Mackenzie de Curitiba, Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital São Vicente, ambos em Curitiba.

Delineamento do estudo

Trata-se de estudo retrospectivo caso-controle

Coleta de casos

Através de busca ativa no sistema de prontuário eletrônico Tasy, foram selecionados 197 casos de carcinomas diferenciados de tireoide (CDT). A seleção ocorreu através da pesquisa pelos códigos do CID-10-10ª versão C73 (neoplasia maligna da glândula tireoide) e D440 (neoplasia de comportamento incerto ou desconhecido da glândula tireoide). Foram coletados dados clínicos e histopatológicos. Também realizada a revisão física dos prontuários e dos laudos anatomopatológicos.

Variáveis relativas ao paciente

Anotou-se informações clínicas de cada caso selecionado, criando-se um protocolo padronizado. Este era constituído pelas seguintes variáveis: iniciais do paciente, idade ao diagnóstico, sexo, número do bloco de parafina, diagnóstico histológico, tipo de tireoidectomia, tamanho do tumor, tipo de tumor e suas variantes, características do tumor como focalidade, invasão de cápsula, invasão angiolinfática, extensão extratireoideana, metástase linfonodal, metástase à distância, tempo livre de doença, progressão da doença, tempo de seguimento, tempo de sobrevivência e óbito. Foi realizado o estadiamento clínico utilizando-se os sistemas Tumor Node Metastasis – TNM AJCC, 2017 (risco de mortalidade).

Progressão da doença

Alguns pacientes, mesmo na vigência do tratamento, apresentaram recidiva da neoplasia ou progressão da doença com piora do estadiamento clínico, seja por retorno do tumor no sítio cirúrgico ou aparecimento de metástase local linfonodal ou à distância em pulmão ou ossos. Esse fato foi considerado como progressão de doença e registrado a data em que foi diagnosticado o ocorrido.

Tempo de seguimento

Ele foi calculado subtraindo-se a data do diagnóstico do carcinoma diferenciado de tireoide pela data em que o paciente foi avaliado pela última vez, seja no ambulatório ou por contato telefônico.

Tempo de sobrevivência e óbito

Foi calculado para todos os pacientes. Não ocorreu óbito nessa população durante o período de seguimento clínico.

Seleção da amostra

Após a seleção inicial dos casos, foi realizada a busca dos respectivos blocos de parafina. Foram selecionados somente os que possuíam massa tumoral suficiente para que fossem realizados cortes adicionais sem que se esgotasse totalmente o material biológico. As lâminas foram reavaliadas por um segundo patologista independente, cego para a história clínica, com intuito de confirmar o diagnóstico de carcinoma diferenciado de tireoide. Para os blocos que não possuíam lâmina H&E foi ela requisitada. Nos casos que havia mais de um bloco de parafina, o patologista escolheu aquele que possuía maior massa neoplásica e realizada a imunomarcagem para o biomarcador ciclina D1.

Critérios de inclusão e exclusão

Inclusão: tireoidectomia por CDT nos 3 hospitais-escola com residência em cirurgia de cabeça e pescoço; casos de carcinomas diferenciados de tireoide com prontuário disponível para verificação dos dados clínicos; pacientes com os dados epidemiológicos completos no prontuário; casos confirmados pelo segundo patologista; blocos de parafina que possuíam massa tumoral suficiente passível de novos fracionamentos sem que se usasse totalmente o material biológico.

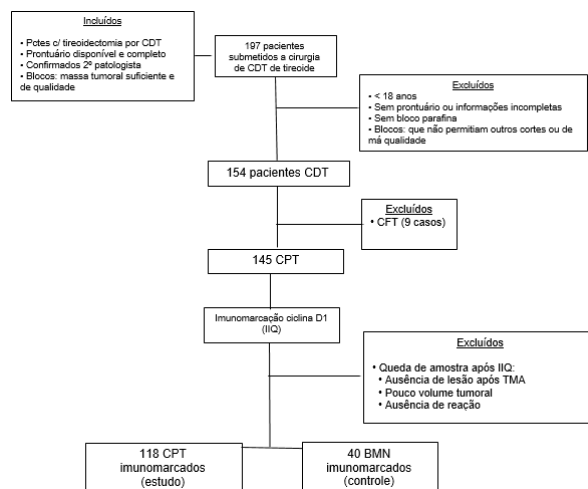
Exclusão: menores de 18 anos; pacientes com diagnóstico de carcinoma folicular de tireoide (CFT) devido ao baixo número (n = 9); ausência do prontuário clínico ou com dados insuficientes; blocos de parafina ausentes, de má qualidade ou material insuficiente para realizar a análise do micro arranjo de tecido (TMA) após ser realizado o desgaste do bloco de parafina; queda da amostra após a imunomarcagem com ciclina D1 (ausência de lesão após confecção do TMA, pouco volume tumoral ou ausência de reação).

Seleção final e confecção do material

Após aplicar os critérios de inclusão e exclusão e realizar a imunomarcagem com ciclina D1, foram selecionados 118 blocos de parafina com amostras de carcinoma papilífero de tireoide (CPT). Para comparação foram selecionados 40 blocos de lesão benigna (bócio multinodular, BMN). Este grupo controle também foi imunomarcado com ciclina D1, sendo selecionado de tireoidectomias efetuadas na mesma época (Figura 1).

Para a confecção dos blocos multiamostrais (tissue microarray - TMA), primeiro foram identificadas as áreas que continham carcinoma nas lâminas e a seguir, foi identificada essa área nos blocos de parafina. Foi criada uma planilha de Excel com os casos, semelhante a um mapa cartesiano

com 6 colunas e 4 linhas. A primeira célula dessa tabela ficou em branco pois serviu de marcação para o início da leitura das lâminas. Nas demais células foram anotados os números de registros dos casos (Figura 2).



CDT=carcinomas diferenciados de tireoide; CPT=carcinomas papilíferos de tireoide; CFT=carcinomas foliculares de tireoide; BMN=bócio multinodular submetido a marcação com ciclina D1

FIGURA 1 – Diagrama de fluxo de seleção de pacientes

PLACENTA	201404	07B5036152-38	09BD013740	10BD00008E	10-15204 1
122818 1,2	1216155-1,2	1218590 1,2	1280755 1,2	12.2940-2	124334 1,2
1212467 3,4	1223164-1	12802373	1280434 4,5	132532-1	1310434 - 3
13.12204.2	13-14922-1	1312316 1	13124373 2	13182502 3	14-5023 2

Fonte: Adaptado de Zella.

FIGURA 2 – Mapa do TMA

O bloco multiamostrais foi confeccionado a partir de um molde de silicone contendo 24 orifícios com diâmetros de 2 mm. O objetivo deste molde era seguir a ordem relacionada na planilha de Excel criada. Iniciou-se pela extração das áreas marcadas dos blocos doadores com o equipamento manual de TMA da marca Tissue Tek Quick Array™ (SAKURA Finetek USA Inc., Torrance, Califórnia, USA) que contém pinças acopladas com diâmetros de 1-2 mm, responsáveis pela extração da área desejada para a realização da imunohistoquímica. Posteriormente, os fragmentos eram alocados nos orifícios correspondentes no molde de silicone, obedecendo a ordem criada na planilha Excel. Para se determinar o ponto inicial da leitura da lâmina, a primeira célula, correspondente ao primeiro orifício deste molde, foi destinado a um tecido não relacionado ao estudo, neste caso um fragmento de placenta.

Após o preenchimento de todos os orifícios, os moldes foram emblocados em parafina. Assim, o bloco de TMA estava pronto para se submeter à microtomia de 5 µm. O material obtido foi colocado em lâminas Superfrost Plus (hidrofílica) para se iniciar a imunomarcagem.

Avaliação histológica

Foi realizada por um único patologista, através de microscopia óptica comum, classificando os carcinomas papilíferos de tireoide de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde. Estas lâminas foram depois reavaliadas por outro patologista independente, cego para a história clínica, para confirmar o diagnóstico.

Os subtipos histológicos eram definidos de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde.¹³

As lâminas obtidas a partir do TMA foram submetidas à técnica da imunoperoxidase, realizada em instrumento Benchmark Ultra™, com processamento 3 em 1 integrado, compreendendo a desparafinização, re-hidratação e recuperação antigênica, com tampões Cell Conditioning 1 (pH alto) e Cell Conditioning 2 (pH baixo). A incubação com anticorpos primários durou entre 16-20 min em temperatura ambiente. A amplificação foi realizada por Ultraview Universal DAB Detection Kit. DAB foi usado como cromógeno e hematoxilina como contra-corantes. O processamento foi todo realizado em plataforma automatizada Ventana Benchmark Ultra™ utilizando o anticorpo ciclina D1. Controles positivos internos e externos atestaram a fidelidade das reações.

O anticorpo utilizado foi cyclin D1, com clone SP4-R (fabricante Ventana), com tecido de controle positivo de mucosa de intestino grosso, com localização da reação nuclear a e pré-diluição do anticorpo. Após a imunomarcagem as lâminas de TMA foram analisadas no microscópio Olympus CX31 e tiveram seu laudo realizado por 2 patologistas diferentes e em tempos diferentes, utilizado os seguintes parâmetros: marcação positiva quando a ciclina D1 teve marcação nuclear; marcação negativa quando o anticorpo não foi visto em nenhuma localização histológica, ou seja, ausência de marcação; e inconclusivo quando não houve a possibilidade de realizar a leitura da lâmina devido qualidade inadequada da amostra.

Avaliação da coloração da ciclina D1 (nuclear) foi determinada semiquantitativamente, com base na intensidade da coloração e a distribuição de células tumorais positivas na lâmina inteira. A imunorreatividade era considerada positiva quando ao menos 1% das células eram positivas. Já colorações <1%, foram consideradas negativas. A intensidade foi classificada em 3 níveis: grau 0 (-) ou ausência de coloração; grau 1 (+) ou coloração fraca; grau 2 (++) ou coloração moderada; grau 3 (+++) ou coloração intensa.^{14,15} Também foi avaliada a distribuição das células tumorais positivas coradas, sendo pontuada da seguinte forma: sem coloração (0); focal (<10% das células); esparsa (10-50%); difusa (>50% das células).^{14,16,17}

Para minimizar as variações de intensidade de coloração, um controle positivo e outro negativo foram incluídos rotineiramente durante o procedimento de coloração. Além disso, o mesmo lote de anticorpo foi usado para todas as lâminas. A imunocoloração foi também avaliada por 2 pesquisadores independentes que não tinham conhecimento prévio dos dados clínicos ou histopatológicos. A mesma metodologia foi empregada para o grupo controle, BMN.

Definições

No presente estudo, o microcarcinoma de tireoide foi definido como um tumor de tireoide de ≤1 cm de diâmetro de acordo com a classificação de 2004 da OMS.¹³ A multifocalidade foi considerada, quando 2 ou mais focos tumorais foram encontrados em 1 lobo ou em 2 lóbulos da tireoide.

Análise estatística

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por médias, desvios-padrão, medianas, valores mínimos e máximos. Para variáveis categóricas foram apresentadas frequências e percentuais. A comparação entre grupos, em relação à idade, foi feita usando-se o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. Variáveis categóricas foram analisadas usando-se o teste exato de Fisher ou o teste de qui-quadrado. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Stata/SE v.14.1. StataCorpLP, USA.

RESULTADOS

Variáveis demográficas e clínicas

O grupotumoral formado por pacientes com carcinoma papilífero de tireoide (n=118) foi predominantemente do sexo feminino (83,1%), com média de idade abaixo de 55 anos (77,1%), e estadiamento clínico I (91,5%) (AJCC/TNM, 2017, Tabela 1).

TABELA 1 — Características clinicopatológicas dos pacientes com CPT

Variável	Classificação	% (n)
Idade ao diagnóstico (anos)	< 55	77,1 (91)
	≥ 55	22,9 (27)
Sexo	Feminino	83,1 (98)
	Masculino	16,9 (20)
Tipo de tireoidectomia	Total	89 (105)
	Parcial	11 (13)
Tamanho do tumor (mm)	≤ 10	36,4 (43)
	10,1 a 20	33,9 (40)
	20,1 a 40	23,7 (28)
	> 40	5,9 (7)
Tipo de tumor	Papilífero	63,6 (75)
	Micropapilífero	36,4 (43)
Variante de tumores papilíferos	Clássico	48 (36)
	Folicular	33,3 (25)
	Célula alta	2,7 (2)
	Oxifílica	13,3 (10)
	Warthin	1,3 (1)
	Macrofolicular	1,3 (1)
	Variante de tumores micropapilíferos	Clássico
Focalidade	Folicular	41,9 (18)
	Oxifílica	2,3 (1)
	Oncofocítica	2,3 (1)
Invasão de capsula	Unifocal	57,6 (68)
	Multifocal	42,4 (50)
Invasão vascular-Invasão Angiolinfática	Sem	90,7 (107)
	Com	9,3 (11)
Invasão extratireoidiana grosseira (2018)	Sem	71,2 (84)
	Com	28,8 (34)
Metástase linfonodal	Não	96,6 (114)
	Sim	3,4 (4)
Metástase à distância	Não	77,1 (91)
	Sim	22,9 (27)
Estadiamento Clínico (AJCC 2017)	Não	95 (112)
	Sim	5 (6)
	I	91,5 (108)
II	7,6 (9)	
	IVb	0,9 (1)

AJCC=American Joint Committee on Cancer; CPT=carcinomas papilíferos de tireoide

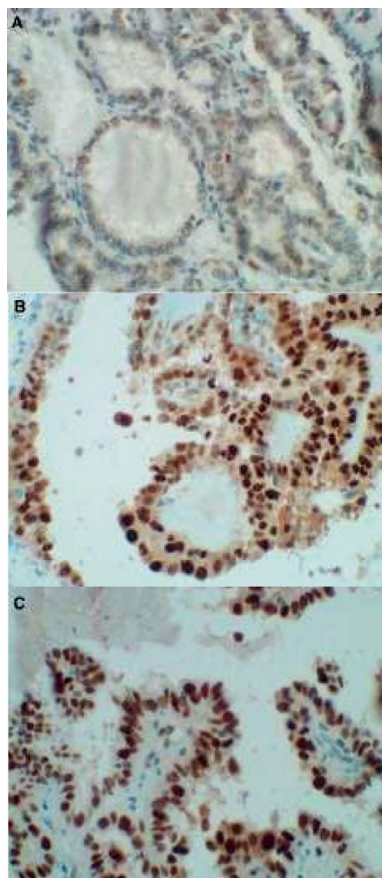
Dados da ciclina D1 nos carcinomas papilíferos

A análise da ciclina D1 (nuclear) foi realizada com base nos dados de 118 pacientes e mostrou que 93,2%

(n=110) coraram com ela e 6,8% (n=8) não. A intensidade de coloração foi homogênea (Tabela 2, Figura 2).

TABELA 2 – Intensidade da coloração da ciclina D1 nos CPT

Ciclina D1 (intensidade)	n	%
Negativo	8	6,8
+/3 (fraca)	42	35,6
+/3 (moderada)	37	31,4
+/3 (forte)	31	26,3
Total	118	100



CPT=carcinoma papilífero de tireoide.

FIGURA 2 – Intensidade de coloração da ciclina D1 nos CPT (em marrom) no núcleo e citoplasma: A) fraca intensidade +/3; B) moderada intensidade +/3; C) forte intensidade +/3 (400X)

A distribuição da coloração da ciclina D1 nesta amostra foi difusa em 71,2% (Tabela 3).

TABELA 3 – Distribuição da coloração da ciclina D1 nos CPT

Ciclina D1 (% coloração)	n	%
Sem coloração	8	6,8
≤ 10% (focal)	6	5,1
10-50% (esparsa)	20	16,9
>50% (difusa)	84	71,2
Total	118	100

Variáveis clínicas e patológicas da ciclina D1 nos CPT

A análise da intensidade e distribuição da coloração da ciclina D1 nos carcinomas papilíferos (CPT) e micropapilíferos de tireoide (CMPT) não mostrou diferenças estatisticamente significantes quanto à idade, sexo, tipo

tumoral, tamanho, invasão focal, invasão vascular e metástase linfonodal (Tabelas 4 e 5 mais a frente).

Comparação dos grupos de estudo (CPT) e controle (BMN)

A maioria dos CPT (93,3%) expressaram a coloração da ciclina D1 no núcleo destas células em todas as intensidades (fraca, moderada e forte) e com distribuição predominantemente difusa (71,2%). No grupo controle BMN 57,5% expressaram a coloração nuclear com predomínio da intensidade fraca (47,5%) e distribuição esparsa (37,5%). A diferença entre o grupo de estudo e controle foi estatisticamente significativa ($p<0,001$) (Tabela 6).

TABELA 6 – Comparação entre o grupo de estudo (CPT) e controle (BMN)

Variável	Classificação	Grupo		p*
		Estudo (CPT n=118)	Controle (BMN n=40)	
Idade (anos)		45,2±12,8	59,5±14,1	<0,001
Idade ao diagnóstico (anos)	< 55	91 (77,1%)	15 (37,5%)	
	≥ 55	27 (22,9%)	25 (62,5%)	<0,001
Sexo	Feminino	98 (83,1%)	37 (92,5%)	
	Masculino	20 (16,9%)	3 (7,5%)	0,196
	Negativo	8 (6,8%)	17 (42,5%)	
Ciclina D1 (intensidade da coloração)	+/3 (fraca)	42 (35,6%)	19 (47,5%)	
	+/3 (moderada)	37 (31,4%)	4 (10,0%)	
	+/3 (forte)	31 (26,3%)	0 (0%)	<0,001
	Sem coloração	8 (6,7%)	17 (42,5%)	
Ciclina D1 (distribuição da coloração)	≤ 10% (focal)	6 (5,1%)	0 (0%)	
	10-50% (esparsa)	20 (17%)	15 (37,5%)	
	>50% (difusa)	84 (71,2%)	8 (20%)	<0,001

CPT=carcinoma papilífero de tireoide; BMN=bócio multinodular. Para idade, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos grupos estudo e controle, versus a hipótese alternativa de médias diferentes (teste t de Student para amostras independentes). Para cada uma das variáveis categóricas, testou-se a hipótese nula de que as distribuições sobre as classificações da variável são iguais nos grupos estudo e controle, versus a hipótese alternativa de distribuições diferentes (teste exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado).

DISCUSSÃO

A recente literatura sobre os CDT incluiu muitos estudos sobre características clínicas, subtipos patológicos e características moleculares; entretanto, a resposta para a questão do porque alguns CDT evoluem com características patológicas mais agressivas encontra-se em aberto na literatura. Avanços em biotecnologia, pesquisas moleculares e estudos genéticos possibilitam melhor compreensão do comportamento dessas neoplasias; entretanto, a avaliação das vias de sinalização e expressão proteica desses tumores torna-se primordial no progresso para o diagnóstico, tratamento e prognóstico na oncologia.

Pacientes estudados com carcinomas papilíferos

O carcinoma papilífero de tireoide é mais prevalente no Brasil assim como no restante do mundo. No entanto, a incidência de outros carcinomas de tireoide como os foliculares e anaplásicos são menos frequentes em nosso meio quando comparado à incidência de países europeus, por exemplo. Uma possível explicação para esta situação poderia estar na suplementação de iodo no sal de cozinha (oligoelemento essencial para a síntese do hormônio tireoideano) como sugerido em uma revisão sistemática recente (OR 2.200; 95% CI 1.389-3.483)¹⁸ A suplementação de iodo no sal de cozinha vem sendo realizado no Brasil desde 1982 com posterior diminuição na sua quantidade desde 2013. O excesso de iodo está associado a mutações BRAF-V600E que

TABELA 4 – Ciclina D1 (intensidade da coloração) no CPT

Variável	Classificação	n	ciclina D1 (intensidade)				p*
			Negativo	+ /3	++ /3	+++ /3	
Idade ao diagnóstico (anos)			44,7±13,4	43,5±13,6	45,0±11,8	48,0±12,9	0,524
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Idade ao diagnóstico (anos)	< 55	91	6 (75)	32 (76,2)	31 (83,8)	22 (71)	0,651
	≥ 55	27	2 (25)	10 (23,8)	6 (16,2)	9 (29)	
Sexo	Feminino	98	8 (100)	35 (83,3)	29 (78,4)	26 (83,9)	0,527
	Masculino	20	0 (0)	7 (16,7)	8 (21,6)	5 (16,1)	
Tipo de tireoidectomia	Total Parcial	105	5 (62,5)	40 (95,2)	35 (94,6)	25 (80,6)	-
		13	3 (37,5)	2 (4,8)	2 (5,4)	6 (19,4)	
Tamanho do tumor (mm)	≤ 10	43	4 (50)	16 (38,1)	12 (32,4)	11 (35,5)	-
	10,1 a 20	40	1 (12,5)	13 (31)	16 (43,2)	10 (32,3)	
	20,1 a 40	28	1 (12,5)	10 (23,8)	8 (21,6)	9 (29)	
	> 40	7	2 (25)	3 (7,1)	1 (2,7)	1 (3,2)	
Tipo de tumor	Papilífero Micropapilífero	75	4 (50)	26 (61,9)	25 (67,6)	20 (64,5)	0,812
		43	4 (50)	16 (38,1)	12 (32,4)	11 (35,5)	
Variante de tumores papilíferos	Clássico folicular célula alta oxifílica Warthin Bócio simile	36	1 (25)	13 (50)	11 (44)	11 (55)	-
		25	3 (75)	12 (46,2)	7 (28)	3 (15)	
		2	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (5)	
		10	0 (0)	1 (3,8)	5 (20)	4 (20)	
		1	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	
		1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	
Variante de tumores micropapilíferos	Clássico folicular oxifílica Oncocítica	23	2 (50)	8 (50)	8 (66,7)	5 (45,5)	-
		18	2 (50)	7 (43,8)	4 (33,3)	5 (45,5)	
		1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,1)	
		1	0 (0)	1 (6,3)	0 (0)	0 (0)	
		1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Focalidade	Unifocal Multifocal	68	5 (62,5)	20 (47,6)	23 (62,2)	20 (64,5)	0,438
		50	3 (37,5)	14 (37,8)	14 (37,8)	11 (35,5)	
Invasão de capsula	Sem Com	107	6 (75)	38 (90,5)	33 (89,2)	30 (96,8)	-
		11	2 (25)	4 (9,5)	4 (10,8)	1 (3,2)	
Invasão vascular (Angiolinfática)	Sem Com	84	7 (87,5)	30 (71,4)	24 (64,9)	23 (74,2)	0,594
		34	1 (12,5)	12 (28,6)	13 (35,1)	8 (25,8)	
Extensão extratireoidiana grosseira (2018)	Sem Com	114	8 (100)	39 (92,9)	36 (97,3)	31 (100)	-
		4	0 (0)	3 (7,1)	1 (2,7)	0 (0)	
Metástase linfonodal	Não Sim	91	8 (100)	32 (76,2)	29 (78,4)	22 (71)	0,378
		27	0 (0)	10 (23,8)	8 (21,6)	9 (29)	
Metástase à distância	Não Sim	112	8 (100)	38 (90,5)	35 (94,6)	31 (100)	-
		6	0 (0)	4 (9,5)	2 (5,4)	0 (0)	
Estadiamento clínico (AJCC 2017)	1	108	7 (87,5)	37 (88,1)	34 (91,9)	30 (96,8)	-
	2	9	1 (12,5)	4 (9,5)	3 (8,1)	1 (3,2)	
	4b	1	0 (0)	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	

AJCC: American Joint Committee on Cancer; CPT=carcinoma papilífero de tireoide; * =ANOVA com um fator (idade); teste de Qui-quadro (variáveis categóricas); p<0,05. (-) Teste não aplicável (baixas frequências). Para idade, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais em todos os grupos definidos pelas classificações de ciclina D1 (coloração e intensidade), versus a hipótese alternativa de que as médias não são todas iguais. Para cada uma das variáveis categóricas, testou-se a hipótese nula de que as distribuições sobre as classificações da variável são iguais para todas as classificações de ciclina D1, versus a hipótese alternativa de que as distribuições não são todas iguais.

são comumente relacionados aos CPT. No Brasil, a ingestão diária de sal pela população é mais do que o dobro (12 g) do recomendado (5 g);¹⁹ isto poderia estar colaborando para o aumento da incidência deste tipo de carcinoma e diminuindo a incidência dos carcinomas foliculares e anaplásicos.²⁰⁻²²

O sexo feminino, idade <55 anos e o estadiamento I prevaleceu em nossa amostra corroborando com a literatura em relação aos CPT.^{12,15,23}

No estudo do prognóstico, dois fatores são importantes; o primeiro, é que independentemente da extensão da operação utilizada, a maioria dos pacientes com carcinoma papilífero de tireoide (80%) apresentam bom prognóstico (como encontrado em nossa pesquisa). O segundo, é que 5% dos pacientes evoluirá ao óbito apesar de qualquer tratamento.^{24,25} Em nossa casuística não ocorreu óbito durante o período de seguimento porque a maioria dos pacientes eram estadio I da AJCC 2017 e com poucos casos com metástases (5%).

Em relação ao tipo da operação realizada, a maioria dos carcinomas papilíferos de tireoide foram submetidos à tireoidectomia total, inclusive os micropapilíferos. Em 2015, uma revisão sobre os microcarcinomas papilíferos de tireoide (<1 cm) mostrou que os classificados como de baixo risco de recorrência pela American Thyroid Association – ATA, não necessariamente deveriam ser submetidos a tireoidectomia total, pois a maioria não cresce ou cresce muito lentamente,

sendo a sua indicação cirúrgica precoce, exagerada. Além disso, quando estes carcinomas mostraram crescimento ou comprometimento linfonodal durante a vigilância ecográfica ativa, mesmo a indicação cirúrgica nesse momento, não se mostrou tardia.²⁶ Acreditamos que um dos fatores relacionados à totalização da tireoidectomia em nosso estudo foi o período da seleção da amostra (2002 a 2017), maioritariamente anterior à última publicação da ATA de 2015.

As metástases linfonodais dos carcinomas papilíferos estão associados à subsequente recidiva locoregional e metástases à distância. Apesar da maioria desses carcinomas serem indolentes e confinados à glândula, 30% podem ter metástases linfonodais clinicamente evidentes, sendo as taxas de micrometástases maiores, dependendo da extensão cirúrgica (dissecções sistemáticas e radicais do tumor), encontradas em até 35-70%.²⁷ A invasão da cápsula de um linfonodo foi relatada em 5-35% das amostras cirúrgicas, enquanto a invasão vascular em 5-10%. Já a incidência de metástases à distância está em torno de 2-10%.²⁸⁻³⁰ Neste trabalho, as metástases linfonodais ocorreram em 22,8% (n=27), a invasão da cápsula em 9,3% (n=11), a invasão vascular em 28,8% (n=34) e a metástase à distância em 5% (n=6).

Avaliação imunoistoquímica da ciclina D1

Para o patologista, o diagnóstico nem sempre é simples, embora tenha se desenvolvido muito no conhecimento destes

TABELA 5 – Ciclina D1 (distribuição da coloração) no CPT

Variável	Classificação	n	Ciclina D1 (distribuição)				p*
			Sem coloração	≤10% (focal)	10-50% (esparça)	>50% (difusa)	
Idade ao diagnóstico (anos)			44,7±13,4	49,0±13,9	46,4±15,2	44,7±12,3	0,846
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Idade ao diagnóstico (anos)	< 55	91	6 (75,0)	4 (66,7)	14 (70,0)	67 (79,8)	0,729
	≥ 55	27	2 (25,0)	2 (33,32)	6 (30,0)	17 (20,2)	
Sexo	Feminino	98	8 (100)	5 (83,3)	14 (70)	71 (84,5)	0,242
	Masculino	20	0 (0)	1 (16,7)	6 (30)	13 (15,5)	
Tipo de tireoidectomia	Total	105	5 (62,5)	6 (100)	18 (90)	76 (90,5)	-
	Parcial	13	3 (37,5)	0 (0)	2 (10)	8 (9,5)	
	≤ 10	43	4 (50)	4 (66,7)	6 (30)	29 (34,5)	
	10,1 a 20	40	1 (12,5)	2 (33,3)	5 (25)	32 (38,1)	
Tamanho do tumor (mm)	20,1 a 40	28	1 (12,5)	0 (0)	7 (35)	20 (23,8)	-
	> 40	7	2 (25)	0 (0)	2 (10)	3 (3,6)	
Tipo de tumor	Papilífero	75	4 (50)	2 (33,3)	14 (70)	55 (65,5)	0,322
	Micropapilífero	43	4 (50)	4 (66,7)	6 (30)	29 (34,5)	
	Clássico folicular	36	1 (25)	0 (0)	9 (64,3)	26 (47,3)	
	célula alta oxifílica	25	3 (75)	2 (100)	3 (21,4)	17 (30,9)	
Variante de tumores papilíferos	Wartlin	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (3,6)	
	Macrofolicular	10	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	9 (16,4)	-
		1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,8)	
		1	0 (0)	0 (0)	1 (7,1)	0 (0)	
	Clássico folicular	23	2 (50)	2 (50)	3 (50)	16 (55,2)	
Variante de tumores micropapilíferos	Oxifílica	18	2 (50)	2 (50)	3 (50)	11 (37,9)	
	Oncocítica	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,4)	-
		1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,4)	
Focalidade	Unifocal	68	5 (62,5)	4 (66,7)	12 (60)	47 (56)	0,936
	Multifocal	50	3 (37,5)	2 (33,3)	8 (40)	37 (44)	
Invasão de capsula	Sem	107	6 (75)	6 (100)	18 (90)	77 (91,7)	-
	Com	11	2 (25)	0 (0)	2 (10)	7 (8,3)	
Invasão vascular (Angiolinfática)	Sem	84	7 (87,5)	6 (100)	15 (75)	56 (66,7)	0,217
	Com	34	1 (12,5)	0 (0)	5 (25)	28 (33,3)	
Extensão extratireoidiana	Sem	114	8 (100)	6 (100)	18 (90)	82 (97,6)	-
	Com	4	0 (0)	0 (0)	2 (10)	2 (2,4)	
Metástase linfonodal	Não	91	8 (100)	6 (100)	16 (80)	61 (72,6)	0,157
	Sim	27	0 (0)	0 (0)	4 (20)	23 (27,4)	
Metástase à distância	Não	112	8 (100)	6 (100)	18 (90)	80 (95,2)	-
	Sim	6	0 (0)	0 (0)	2 (10)	4 (4,8)	
Estadiamento clínico (AJCC 2017)	1	108	7 (87,5)	6 (100)	17 (85)	78 (92,9)	
	2	9	1 (12,5)	0 (0)	3 (15)	5 (6)	-
	4b	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,2)	

AJCC=American Joint Committee on Cancer; CPT=carcinoma papilífero de tireoide; * =ANOVA com um fator (idade); teste de Qui-quadrado (variáveis categóricas); p<0,05. (-) Teste não aplicável (baixas frequências). Para idade, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais em todos os grupos definidos pelas classificações de ciclina D1 (coloração e intensidade), versus a hipótese alternativa de que as médias não são todas iguais. Para cada uma das variáveis categóricas, testou-se a hipótese nula de que as distribuições sobre as classificações da variável são iguais para todas as classificações de ciclina D1, versus a hipótese alternativa de que as distribuições não são todas iguais.

carcinomas desde a terceira edição da classificação dos tumores endócrinos pela Organização Mundial da Saúde em 2004 até a 4ª edição de 2017.^{13,31} O emprego da imunistoquímica ainda é recurso muito útil ao patologista por auxiliar na diferenciação entre os tecidos malignos e benignos, bem como entre os malignos.

A descoberta das ciclinas do tipo D na década de 1990 proporcionou importante informação sobre a interação dos sinais extracelulares com o ciclo celular central para impulsionar a proliferação celular. A expressão desenfreada destas ciclinas e das enzimas por elas reguladas (quinases - CDK4 e CDK6), contribuiu com a tumorigênese, frequentemente observada em diversos carcinomas como pulmão, esôfago, mama e de cabeça e pescoço.³²⁻³⁴ Desde a década de noventa com os trabalhos de Lazzereschi et al.³⁵, a ciclina D1 vem sendo estudada nos carcinomas papilíferos de tireoide utilizando a imunistoquímica. Nos primeiros relatos, esse marcador molecular foi encontrado superexpresso no núcleo das células dos carcinomas papilíferos e a nível de citoplasma nos tecidos benignos e adenomas, sugerindo que

a ciclina D1 poderia ter papel na origem dos carcinomas papilíferos de tireoide. Em nosso trabalho, dos 118 casos a grande maioria (93,2%, n=110) expressou a ciclina D1 com predomínio nuclear.

A expressão dela na tireoide tem sido aplicada como auxílio no diagnóstico^{12,14,36,37} e na diferenciação das variantes desse carcinoma,^{38,39} entretanto, em nossa casuística não observamos diferenças de expressão da ciclina D1 entre os carcinomas papilíferos e micropapilíferos e não foi possível observar diferenças nas outras variantes do carcinoma papilífero devido às baixas frequências. A expressão da ciclina D1 nos carcinomas papilíferos de tireoide e a agressividade tumoral com suas implicações no prognóstico foram demonstradas por alguns autores.^{10,15,23,40-43}

Embora nosso estudo tenha analisado mais variáveis (sexo, idade do diagnóstico, tipo de tumor, tamanho, variantes, focalidade, invasão capsular e angiolinfática, extensão extratireoideana grosseira, metástase linfonodal e à distância) não foi observado qualquer tipo de correlação significativa na expressão da ciclina D1 (intensidade de coloração e distribuição) com a

agressividade tumoral, possivelmente porque, nossa amostra foi composta por carcinomas papilíferos de baixo estadiamento clínico (91,5%) conforme AJCC2017.⁴⁴

De maneira semelhante aos autores Muro-Cacho et al.⁴², a nossa casuística mostrou que nesses carcinomas a ciclina D1 apresentou expressão predominantemente nuclear (93,2%, n=110), com intensidade moderada a forte e distribuição predominantemente esparsa e difusa (88,1%, n=104), sugerindo que a maior expressão dela poderia ter papel no desenvolvimento destes tumores.

Ao comparar a expressão da ciclina D1 em CDT (43 papilíferos e 23 foliculares) e tecidos benignos tireoidianos (adenomas foliculares) como diagnóstico diferencial em situações de difícil diferenciação, Seybt et al.¹² mostraram que os carcinomas papilíferos e suas variantes tiveram maior intensidade na coloração da ciclina D1 do que os foliculares (88% vs. 61%, p=0,013) e adenomas foliculares (88 vs. 52%, p<0,001) com distribuição predominantemente difusa (p=0,0032). Neste estudo comparamos a expressão da ciclina D1 e observamos marcação de moderada a forte intensidade nos CPT e fraca no BMN (57,7% vs. 4%; p<0,001), com distribuição predominantemente difusa (71,2% vs. 20%; p<0,001), sugerindo que a maior expressão da ciclina D1 nos tecidos tireoidianos poderia ter papel no desenvolvimento dos tumores.

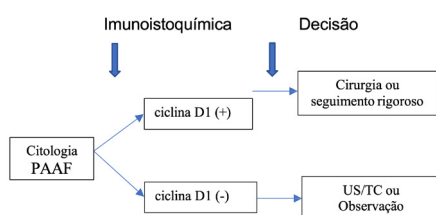
Por outro lado e ao contrário da literatura^{36,37}, os nossos microcarcinomas papilíferos expressaram ciclina D1 na maioria da amostra.

Ciclina D1 e tumorigênese

A ciclina D1 tem sido associada às neoplasias malignas em humanos, principalmente quando a mutação BRAF-V600E está presente.^{32-34,45,46} Em nosso trabalho, a superexpressão do marcador ciclina D1 nos carcinomas papilíferos de tireoide, corrobora com os estudos que implicam esta proteína na origem dos carcinomas de tireoide por estimular a proliferação celular contribuindo com a tumorigênese.^{46,47}

Perspectivas futuras

Como a análise da expressão da ciclina D1 por imunohistoquímica na diferenciação entre BMN e carcinoma papilífero de tireoide mostrou-se útil principalmente se presente a coloração difusa, este marcador molecular poderia ter papel diferenciador para o clínico e patologista em amostras adquiridas pela punção aspirativa por agulha fina para auxiliar no diagnóstico de carcinoma papilífero em nódulos com características indeterminadas. No entanto, dados adicionais devem ser necessários para corroborar com esta hipótese. Segue na Figura 3 proposta de uso.



Fonte: Adaptado de Teshima, M. et al (2019). CPT=carcinoma papilífero de tireoide; PAAF=punção aspirativa por agulha fina; US=ultrassom; TC=tomografia computadorizada

FIGURA 3 – Estratégia de decisão para o CPT com base na ciclina D1

CONCLUSÃO

A ciclina D1 foi expressa na grande maioria dos carcinomas papilíferos de tireoide sendo a distribuição difusa predominante. O tecido benigno – bócio multinodular - expressou a coloração 1 com intensidade fraca e distribuição esparsa. A expressão dela não se correlacionou com achados clinicopatológicos (tamanho do tumor, invasão angiolinfática, metástase linfonodal ou metástases à distância) nesses carcinomas.

Contribuição dos autores:

Conceituação: Ivan José Paredes Bartolomei

Administração do projeto: Carmen Australia Paredes Marcondes Ribas, Maria

Metodologia: Augusta Karas Zella

Análise formal: Ana Maria Waaga-Gasser

Supervisão: Martin Gasser

Redação (esboço original): Nicolau Gregori Czecko, Paulo Afonso Nunes Nassif

Redação (revisão e edição): Todos os autores

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde (INCA). Rio de Janeiro: 2017.
2. Chitikova Z, Pusztaszeri M, Makhlof AM, Berczy M, Delucinge-Vivier C, Triponez F, et al. Identification of new biomarkers for human papillary thyroid carcinoma employing NanoString analysis. *Oncotarget*. 2015;6(13):10978-93. Doi: 10.18632/oncotarget.3452
3. Cobin RH, Gharib H, Bergman DA, Clark OH, Cooper DS, Daniels GH, et al. AACE/AAES Medical/Surgical Guidelines for Clinical Practice: Management of Thyroid Carcinoma. *Endocrine Pract*. 2001 May;7(3):202-20. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1530891X20420142?via%3Dihub>.
4. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee UK, Lee YJ, et al. The association of the BRAFV600E mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: A meta-analysis. *Cancer*. 2012; 18(7):1764-73. Doi: 10.1002/cncr.26500
5. Bertagna F, Treglia G, Picardo A, Giubbini R. Diagnostic and Clinical Significance of F-18-FDG-PET/CT Thyroid Incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(11):3866-75. Doi: 10.1210/jc.2012-2390
6. Barbet J, Champion L, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6077-84. Doi: 10.1210/jc.2005-0044
7. Giovanella L, Ceriani L, Maffioli M. Postsurgery serum thyroglobulin disappearance kinetic in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2010;32(5):568-71. Doi: 10.1002/hed.21214
8. Giraudet AL, Ghulzan AA, Aupérin A, Leboulloux S, Chehboun A, Troalen F, et al. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(2):239-46. Doi: 10.1530/EJE-07-0667
9. Miyauchi A, Kudo T, Miya A, Kobayashi K, Takamura Y, Higashiyama T, et al. Prognostic impact of serum thyroglobulin doubling-time under thyrotropin suppression in patients with papillary thyroid carcinoma who underwent total thyroidectomy. *Thyroid*. 2011;21(7):707-16. Doi: 10.1089/thy.2010.0355
10. Pesutić-Pisac V, Punda A, Gluncic I, Bedekovic V, Kragic AP, Kunac N. Cyclin D1 and p27 expression as prognostic factor in papillary carcinoma of thyroid: association with clinicopathological parameters. *Croat Med J*. 2008;49:643-9. Doi: 10.3325/cmj.2008.5.643
11. Bhaijee F, Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol*. 2011;22:126-33. Doi: 10.1007/s12022-011-9170-y
12. Seybt TP, Ramalingam P, Huang J, Looney SW, Reid MD. Cyclin D1 expression in benign and differentiated malignant tumors of the thyroid gland: diagnostic and biologic implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(2):124-30. Doi: 10.1097/PAI.0B013E31822D4783
13. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon, France: IARC Press; 2004
14. Antonaci A, Consorti F, Mardente S, Natalizi S, Giovannone G, Rocca CD. Survivin and cyclin D1 are jointly expressed in thyroid papillary carcinoma and microcarcinoma. *Oncol Rep*. 2008;20(1):63-7

15. Lee SH, Lee JK, Jin SM, Lee KC, Sohn JH, Char SW, et al. Expression of cell-cycle regulators (cyclin D1, cyclin E, p27kip1, p57kip2) in papillary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;142(3):332-7. Doi: 10.1016/j.otohns.2009.10.050
16. Khoo MLC, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1810-3. Doi: 10.1210/jcem.87.4.8352
17. Khoo MLC, Beasley NJP, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1814-18. Doi: 10.1210/jcem.87.4.8353
18. Lee JH, Hwang Y, Song R, Yi JW, Yu HW, Kim SJ, et al. Relationship between iodine levels and papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2017;39(8):1711-8. Doi: 10.1002/hed.24797
19. World Health Organization (WHO). Assessment of the iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. Geneva: WHO; 2007
20. Franceschi S. Iodine intake and thyroid carcinoma: A potential risk factor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1998;106 Suppl 3:538-44
21. Guan H, Ji M, Bao R, Yu H, Wang Y, Hou P, et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1612-7. Doi: 10.1210/jc.2008-2390
22. Knobel M, Medeiros-Neto G. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(5):701-12
23. Balta AZ, Filiz AI, Kurt Y, Sucullu I, Yucell E, Akin ML. Prognostic value of oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Med Oncol.* 2012;29(2):734-41. Doi: 10.1007/s12032-011-9969-x
24. Brown RL, De Souza JA, Cohen EE. Thyroid cancer: Burden of illness and management of disease. *J Cancer.* 2011;2:193-9
25. Shaha AR. Implications of Prognostic Factors and Risk Groups in the Management of Differentiated Thyroid Cancer. *Laryngoscope.* 2004;114(3):393-402
26. Ito Y, Miyauchi A. Nonoperative management of low-risk differentiated thyroid carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 2015;27(1):15-20. Available from 622-201501000-00004
27. Harit DM, Lebouleux S, Ghuzlan AA, Baudin E, Chami L, Schlumberger M, et al. Optimization of staging of the neck with prophylactic central and lateral neck dissection for papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg.* 2012;255(4):777-83. Doi: 10.1097/SLA.0b013e31824b7b68
28. Nie X, Tan Z, Ge M, Jiang LH, Wang JF, Zheng CM. Risk factors analyses for lateral lymph node metastases in papillary thyroid carcinomas: A retrospective study of 356 patients. *Arch Endocrinol Metab.* 2016;60(5):492-99. Doi: 10.1590/2359-3997000000218
29. Rotstein L. The role of lymphadenectomy in the management of papillary carcinoma of the thyroid. *J Surg Oncol.* 2009;99:186-88
30. Tuttle RM. Papillary thyroid cancer. In: Post TW, editor. *UpToDate.* Waltham, MA: UpToDate Inc.; 2018. Available from https://www.uptodate.com/contents/papillary-thyroid-cancer?source=bookmarks_widget#H13329960
31. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th ed. WHO Press; 2017
32. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 1998;51(1):1-7
33. Perisanidis C, Perisanidis B, Wrba F, Brandstetter A, Gazzar SE, Papadogeorgakis N, et al. Evaluation of immunohistochemical expression of p53, p21, p27, cyclin D1, and Ki67 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(1):40-6. Doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01071.x
34. Sheyn I, Noffsinger AE, Helffelfinger S, Davis B, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. Amplification and expression of the cyclin D1 gene in anal and esophageal squamous cell carcinomas. *Hum Pathol.* 1997;28(3):270-6. Doi: 10.1016/s0046-8177(97)90123-4
35. Lazzereschi D, Sambuco L, Scalzo CC, Ranieri A, Mincione G, Nardi F, et al. Cyclin D1 and Cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Int J Cancer.* 1998;76(6):806-11. Doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980610)76:6<806::aid-ijc7>3.0.co;2-1
36. Kovacs GL, Stelkovic E, Krenacs L, Gonda G, Goth M, Kovacs L, et al. Low level of cyclin D1 protein expression in thyroid microcarcinomas from an autopsy series. *Endocrine.* 2005;26(1):41-4. Doi: 10.1385/ENDO:26:1:041
37. Kovacs GL, Stelkovic E, Krenacs L, Gonda G, Goth M, Kovacs L, et al. Low level of cyclin D1 protein expression in thyroid microcarcinomas from an autopsy series. *Endocrine.* 2005;26(1):41-4. Doi: 10.1385/ENDO:26:1:041
38. Erickson LA, Jin L, Wolan PC, Tromson GB, Heerden JV, Lloyd RV. Expression of p27(kip1) and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol.* 1998;11(2):169-74
39. Temmim L, Ebraheem AK, Baker H, Sinowatz F. Cyclin D1 Protein Expression in Human Thyroid gland and Thyroid Cancer. *Anat, Histol, Embryol.* 2006 Apr;35(2):125-29. Doi: 10.1111/j.1439-0264.2005.00648.x
40. Jung CK, Kang YG, Bae JS, Lim DJ, Choi YJ, Lee KY. Unique patterns of tumor growth related with the risk of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 2010;23(9):1201-8. Doi: 10.1038/modpathol.2010.116
41. Londero SC, Godballe C, Krogdahl A, Bastholt L, Specht L, Sorensen CH, et al. Papillary microcarcinoma of the thyroid gland: Is the immunohistochemical expression of cyclin D1 or galectin-3 in primary tumour an indicator of metastatic disease? *Acta Oncol.* 2008;47(3):451-7. Doi: 10.1080/02841860701630242
42. Muro-Cacho CA, Holt T, Klotch D, Mora L, Livingston S, Futran N. Cyclin D1 Expression as a Prognostic Parameter in Papillary Carcinoma of the Thyroid. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;120(2):200-7. Doi: 10.1016/S0194-5998(99)70407-9.
43. Wang S, Wu J, Savas L, Patwardhan N, Khan A. The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum Pathol.* 1998;29(11):1304-9. Doi: 10.1016/s0046-8177(98)90262-3
44. Amin MB, Greene F, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93-9. Doi: 10.3322/caac.21388
45. Mekel M, Nucera C, Hodin RA, Parangi S. Surgical implications of B-RafV600E mutation in fine-needle aspiration of thyroid nodules. *Am J Surg.* 2010;200(1). Doi: 10.1016/j.amjsurg.2009.08.029
46. Nucera C, Pontecorvi A. Clinical outcome, role of BRAFV600E, and molecular pathways in papillary thyroid microcarcinoma: Is it an indolent cancer or an early stage of papillary thyroid cancer? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:33. Doi: 10.3389/fendo.2012.00033
47. Teshima M, Tokita K, Ryo E, Matsumoto F, Kondo M, Ikegami Y, et al. Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules. *BMC Cancer.* 2019;18;19(1):245. Doi: 10.1186/s12885-019-5452-4