

José Miguel Lourenço Aviz Miranda de Melo

BIOMARCADORES MOLECULARES DE PROGNÓSTICO E SELEÇÃO TERAPÊUTICA EM CARCINOMAS DA TIROIDE DE DIFERENCIAÇÃO FOLICULAR

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, no Ramo de Medicina, na Especialidade de Medicina Interna/Endocrinologia, Doenças do Metabolismo e Nutrição, orientada pela Senhora Professora Doutora Manuela Carvalheiro e pela Senhora Professora Doutora Paula Soares e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Julho de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

BIOMARCADORES MOLECULARES DE PROGNÓSTICO E SELEÇÃO TERAPÊUTICA EM CARCINOMAS DA TIROIDE DE DIFERENCIAÇÃO FOLICULAR

José Miguel Lourenço Aviz Miranda de Melo

Tese submetida para candidatura a provas para grau em Doutor em Ciências da Saúde, no ramo de Medicina, na Especialidade de Medicina Interna/Endocrinologia, Doenças do Metabolismo e Nutrição, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Julho de 2014

O essencial é saber ver,
Saber ver sem estar a pensar,
Saber ver quando se vê,
E nem pensar quando se vê,
Nem ver quando se pensa.

Alberto Caeiro, *in* "O Guardador de Rebanhos - Poema XXIV"
Heterónimo de Fernando Pessoa

*The brick walls are there for a reason. The brick walls are not there to keep us out.
The brick walls are there to give us a chance to show how badly we want something.*
Randy Pausch, *in* "The last lecture"

Esta Tese foi escrita de acordo com as regras do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

Publicações

Ao abrigo do disposto no nº 2, alínea a) do artigo 31º do Decreto-Lei n.º 230/2009, fazem parte integrante desta tese de doutoramento os seguintes trabalhos já publicados:

Artigo I – **Melo M**, Gosta G, Carrilho F, Carvalheiro M, Soares P. Radiotherapy: radioiodine and external beam irradiation treatment of differentiated thyroid carcinomas. *Clinical Management of Thyroid Cancer*. 1ed. Future Medicine Ltd, 2013, p. 78-92. doi: 10.2217/ebo.12.383

Artigo II - **Melo M**, Costa G, Ribeiro C, Carrilho F, Martins MJ, da Rocha AG, Sobrinho-Simões M, Carvalheiro M, Soares P. Stimulated thyroglobulin at recombinant human TSH-aided ablation predicts disease-free status one year later. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Nov; 98(11):4364-72. doi: 10.1210/jc.2013-2267. Epub 2013 Sep 13.

Artigo III - Vinagre J*, Almeida A*, Pópulo H*, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, **Melo M**, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M, Lima J, Máximo V, Soares P. Frequency of *TERT* promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013; 4:2185. doi: 10.1038/ncomms3185.

* Autores com contribuição idêntica para o trabalho

Artigo IV - **Melo M***, da Rocha AG*, Vinagre J*, Batista R, Peixoto J, Tavares C, Celestino R, Almeida A, Salgado C, Eloy C, Castro P, Prazeres H, Lima J, Amaro T, Lobo C, Martins MJ, Moura M, Cavaco B, Leite V, Cameselle-Teijeiro JM, Carrilho F, Carvalheiro M, Máximo V, Sobrinho-Simões M, Soares P. *TERT* promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 May; 99(5):E754-65. doi: 10.1210/jc.2013-3734. Epub 2014 Jan 29

* Autores com contribuição idêntica para o trabalho

Artigo V – Soares P, Celestino R, **Melo M**, Fonseca E, Sobrinho-Simões M. Prognostic biomarkers in thyroid cancer. *Virchows Arch*. 2014 Mar;464(3):333-46. doi: 10.1007/s00428-013-1521-2. Epub 2014 Feb 1.

Resumo

Os carcinomas da tireoide derivados do epitélio folicular representam um desafio para os clínicos no que diz respeito à determinação do prognóstico dos doentes. Este grupo incluiu desde uma das neoplasias malignas com melhor prognóstico – o carcinoma papilar, com uma sobrevivência aos 10 anos de 95-98% – até uma das neoplasias mais agressivas – o carcinoma anaplásico, com uma mediana do tempo de sobrevivência de 5-6 meses. Os carcinomas diferenciados da tireoide, que incluem os histotipos papilar e folicular, representam cerca de 90-95% dos casos. Apesar de a maioria ter um bom prognóstico, cerca de 10-20% vem a apresentar doença loco-regional ou metastática à distância, por vezes décadas após o diagnóstico inicial, podendo esta doença persistente ou recorrente acabar por ser letal.

A falta de bons indicadores de prognóstico neste grupo motivou a elaboração do presente trabalho, o qual teve como objetivo geral a identificação de fatores clínico-patológicos, bioquímicos e moleculares que possam ser utilizados como indicadores de prognóstico em doentes com carcinomas diferenciados da tireoide. No estudo clínico-patológico e bioquímico, constituiu um objetivo específico estudar o valor preditivo do doseamento da tiroglobulina estimulada no momento da ablação preparada com TSH humana recombinante (rhTSH) para ausência de doença um ano depois, comparando-o com um doseamento semelhante após estimulação com TSH endógena. No estudo clínico-patológico e molecular, os objetivos específicos foram estudar o valor prognóstico das mutações somáticas do *BRAF* (características do carcinoma papilar e também presentes em menor frequência nos tumores indiferenciados) e *NRAS* (características dos tumores com morfologia folicular), com ênfase na associação com metastização à distância, resposta ao tratamento, persistência da doença no final do seguimento e mortalidade específica pelo carcinoma da tireoide. Pretendemos também contribuir para o conhecimento da oncobiologia dos carcinomas derivados do epitélio folicular, através da identificação de novas alterações moleculares, nomeadamente através da pesquisa de mutações no promotor do *TERT*. Para além da sua frequência, avaliámos a influência das mutações no promotor do *TERT* no comportamento biológico dos tumores, analisando também o seu valor prognóstico nos moldes anteriormente mencionados para o *BRAF* e *NRAS*.

Para o estudo clínico-patológico e bioquímico, foi utilizada uma amostra constituída por 297 doentes. Para o estudo clínico-patológico e molecular utilizaram-se 647 amostras de tecido tiroideu normal, com patologia benigna e maligna, nas quais se incluíam amostras correspondentes a 469 doentes com carcinomas da tireoide derivados do epitélio folicular.

No estudo clínico-patológico e bioquímico, a tiroglobulina estimulada no momento da ablação sob rhTSH demonstrou ser um indicador de prognóstico independente para ausência de doença um ano depois, tendo o ponto de corte otimizado sido definido nos 7,2 ng/mL, ao qual correspondeu um valor preditivo negativo de 90%. Concluiu-se que um valor estimulado de tiroglobulina abaixo daquele valor pode ser considerado um fator de prognóstico favorável.

No estudo clínico-patológico e molecular, as mutações do *BRAF* associaram-se a uma idade mais avançada dos doentes, não tendo sido encontrada qualquer outra associação com fatores

clínico-patológicos sugestivos de comportamento mais agressivo, nem com pior resposta ao tratamento. A presença da mutação do *BRAF* não influenciou de forma significativa a percentagem de doentes com persistência de doença no final do seguimento ou a mortalidade específica. Estes dados sugerem que as mutações do *BRAF* não são, pelo menos *per se*, um indicador de prognóstico relevante.

As mutações do *NRAS* não se associaram a nenhuma característica clínico-patológica sugestiva de comportamento agressivo. A resposta ao tratamento, percentagem de doentes com doença persistente e mortalidade específica foram semelhantes quando se compararam os grupos de doentes com tumores com e sem mutação do *NRAS*. As mutações do *NRAS* não parecem ter valor prognóstico em carcinomas diferenciados da tiroide.

A presença de mutações no promotor do *TERT* restringiu-se aos carcinomas da tiroide derivados do epitélio folicular, não tendo sido encontradas em tecido tiroideu normal, lesões benignas ou carcinomas medulares. Nos carcinomas diferenciados, as mutações no promotor do *TERT* associaram-se significativamente com idade mais avançada dos doentes, maior tamanho do tumor, metastização à distância e estádios mais avançados. Os doentes com carcinomas diferenciados com mutação no promotor do *TERT* apresentaram uma pior resposta ao tratamento. A presença de mutações no promotor do *TERT* foi um fator preditivo independente de doença persistente no final do seguimento e de maior mortalidade específica pela doença. Este facto, em combinação com os anteriores, permite concluir que as mutações no promotor do *TERT* são um indicador de prognóstico *major* em doentes com carcinoma diferenciado da tiroide.

Abstract

Follicular cell-derived thyroid carcinomas represent a particularly challenging problem for clinicians from the prognostic standpoint. In fact, this group of tumors encompasses one of the least lethal human cancers – the papillary thyroid carcinoma, with a 10-year survival rate of 95-98% - and, on the other side of the spectrum, one of the deadliest forms of cancer – the anaplastic thyroid carcinoma, with a median survival of 5-6 months. The differentiated thyroid carcinomas, which include papillary and follicular thyroid carcinomas, represent 90-95% of the whole cases. Even though the majority of differentiated thyroid carcinomas carry a good prognosis, 10-20% of patients will eventually develop loco-regional or distant metastases, sometimes several decades after the initial diagnosis, and some of these recurrent or persistent tumors may lead to a fatal outcome.

The lack of good prognostic markers in differentiated tumors encouraged the implementation of the present study, which aimed at identifying clinico-pathological, biochemical and molecular factors that may be used as prognostic markers in patients with differentiated thyroid carcinoma. In the clínico-pathological and biochemical part of the study, the specific objective was to evaluate the predictive value of stimulated thyroglobulin at recombinant human TSH (rhTSH)-aided ablation in predicting disease-free status one year later, and to compare it with the predictive value of stimulated thyroglobulin at ablation under endogenous TSH stimulation. In the clinico-pathological and molecular part of the study, the specific objectives were to study the prognostic value of somatic *BRAF* mutations (typical of papillary carcinoma, but also found in undifferentiated tumors) and *NRAS* (typical of tumors with follicular morphology) for distant metastasization, response to treatment, disease persistence at the end of follow-up and disease-specific mortality. The present study also intended to contribute to the clarification of thyroid cancer oncogenesis through the identification of novel molecular alterations, specifically by looking for *TERT* promoter mutations in thyroid lesions; besides the evaluation of its frequency in thyroid carcinomas, the study also aimed at analyzing its prognostic meaning.

For the clinico-pathological and biochemical part of the study, 297 patients were included. For the clinico-pathological and molecular part of the study, 647 thyroid tissue samples were included, representing normal thyroid, benign and malignant lesions, which corresponded to 469 patients with follicular cell-derived carcinomas.

In the clinico-pathological and biochemical part of the study, stimulated thyroglobulin at rhTSH-aided ablation proved to be an independent prognostic marker of disease-free status one year later. The highest accuracy cutoff value was established at 7.2 ng/mL, with a negative predictive value of 90%. We concluded that a thyroglobulin value below that threshold may be considered a favorable prognostic factor.

In the clínico-pathological and molecular part of the study, *BRAF* mutations were associated with older age; no associations were found with other clínico-pathological factors or with response to treatment. The percentage of patients with disease persistence at the end of follow-up was not significantly different between the groups of patients with or without *BRAF* mutation.

Disease-specific mortality was also similar in the aforementioned groups. These data suggest that *BRAF* mutations are not, at least *per se*, a relevant prognostic factor.

NRAS mutations were not associated with any clinico-pathological feature suggestive of aggressive behavior. The response to treatment, percentage of patients with disease persistence at the end of follow-up and disease-specific mortality were similar when the group of patients with tumors harboring *NRAS* mutations was compared with the group of patients with wild-type *NRAS*. *NRAS* mutations do not seem to have prognostic value in differentiated thyroid carcinomas.

TERT promoter mutations were only detected in follicular cell-derived thyroid carcinomas; no mutations were found in normal thyroid tissue, benign lesions or medullary carcinoma. In differentiated carcinomas, *TERT* promoter mutations were associated with older age, larger tumor size, distant metastases and higher stages. Patients with differentiated *TERT*-mutated tumors had worse response to treatment. *TERT* promoter mutations were an independent predictor of disease persistence at the end of follow-up and of disease-specific mortality. Taking the whole set of data into account, we concluded that *TERT* promoter mutations are a major prognostic indicator in differentiated thyroid carcinomas.

Agradecimentos

O presente trabalho representou um projeto conjunto para o qual contribuíram com empenho muitas pessoas. Manifesto aqui os meus profundos e reconhecidos agradecimentos a todas os envolvidos, pela generosidade, dedicação e tempo despendidos.

À minha Orientadora, Professora Doutora Manuela Carvalheiro, pelo incentivo desde o primeiro momento para que este trabalho fosse concretizado, por ter lançado as bases e criado as condições que levaram à sua execução. Agradeço também toda a ajuda e contribuição para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, durante o período em que dirigiu o Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

À minha Orientadora, Professora Doutora Paula Soares, por todo o empenho, dedicação, qualidade e rigor científicos demonstrados na orientação deste trabalho. Para além disso, agradeço a enorme generosidade nas muitas horas de trabalho em conjunto, assim como a alegria, o entusiasmo e o carinho com que me incentivou nestes anos. Os ensinamentos sobre quase tudo o que diz respeito a um trabalho científico de investigação foram tantos e tão variados que só há uma maneira de agradecer: a palavra obrigado.

Ao Professor Doutor Manuel Sobrinho Simões, pela forma como me recebeu no IPATIMUP, pela sempre disponível ajuda para a realização das tarefas mais complicadas e pelo enorme privilégio de conviver com a singular qualidade científica e humana que o caracterizam.

Ao Dr. Francisco Carrilho, pelo interesse que cultivou em mim relativamente à patologia tiroideia desde os tempos de interno, assim como pela constante busca pela inovação que o caracteriza e contagia quem o rodeia. Agradeço também o carinho e apoio que manifestou ao longo da realização deste trabalho, proporcionando-me condições únicas para a sua realização.

À Dr.^a Adriana Gaspar da Rocha, pela forma como me recebeu no laboratório e foi capaz de transformar um clínico sem experiência laboratorial em alguém que se consegue mexer no laboratório com o mínimo de à vontade, capaz de perceber o que lá se passa e executar as tarefas necessárias à persecução dos objetivos do trabalho. Agradeço também todo o rigor que me transmitiu na realização das técnicas laboratoriais, no registo do trabalho e na organização dos resultados. Mas muito para além disso, manifesto o meu reconhecimento por todo o carinho e apoio manifestado ao longo destes anos, em especial nos momentos em que o trabalho não correu como planeado e quando surgiram problemas de saúde na minha família. Obrigado Adriana, sem a tua contribuição este trabalho não teria sido possível.

A todo o grupo *Cancer Biology*, pela forma como me receberam, integraram e ajudaram; posso dizer que sempre que precisei de auxílio de qualquer tipo, quem estivesse por perto estava sempre disponível para me ajudar. Deixo um agradecimento especial ao João Vinagre, ao Ricardo Celestino, à Helena Pópulo e à Catarina Tavares, pela forma mais próxima com que trabalhámos em alguns períodos.

Aos meus colegas do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), manifesto um reconhecimento muito especial por todo o apoio manifestado, humano e científico. Foi muito importante sentir que todos de alguma forma me

apoiavam. Agradeço a disponibilidade de todos para possibilitarem alguma flexibilidade nas tarefas assistenciais que desempenhei no decurso da realização do presente trabalho. Um obrigado especial à Professora Doutora Leonor Gomes, pelos conselhos sempre sábios, pela enorme disponibilidade, pelo rigor científico e pelo carinho manifestados. Expresso também o meu agradecimento particular ao Dr. Luis Miguel Cardoso, pela enorme ajuda na concepção dos gráficos incluídos neste trabalho.

À Dr.^a Gracinda Costa, do Serviço de Medicina Nuclear dos HUC, pela disponibilidade permanente, qualidade científica, entusiasmo que manifestou ao longo destes anos, aliados ao carinho e simpatia que a caracterizam. Obrigado Gracinda.

À Dr.^a Maria João Martins, pela enorme disponibilidade, rigor técnico-científico e trabalho prolongado que permitiram que este trabalho fosse possível. Agradeço também o brilhante sentido de humor, que encurtou as tarefas e as horas de trabalho.

À Dr.^a Margarida Marques, Engenheira Informática do Serviço de Tecnologias e Sistemas de Informação do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, os meus sinceros agradecimentos pela incedível disponibilidade, boa vontade e profissionalismo que manifestou na revisão da análise estatística.

À Genzyme, pelo apoio concedido que permitiu a realização deste trabalho. Não posso deixar de enaltecer o empenho pessoal da Doutora Ana Crespo e da Dr.^a Antónia Parreira em concretizar este projeto e dar-lhe divulgação.

A muitos colegas com quem me cruzei neste trajeto, agradeço as palavras de incentivo, os conselhos sábios e muitos pormenores que, parecendo pequenos, no seu conjunto foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial aos doentes, por numa situação de fragilidade ainda serem capazes de mostrar generosidade e manifestarem palavras de encorajamento. Talvez por isso transmitam uma energia inigualável aos profissionais de saúde, levando-os a trabalhar mais e melhor.

Aos amigos, pelo conforto e pelo suporte que foram capazes de mostrar em todos os momentos.

Aos meus pais e avós, pelo apoio incondicional que me dão em tudo na vida e também na realização deste projeto.

A todos aqueles que, não tendo sido mencionados, me têm acompanhado e apoiado.

Lista de abreviaturas e acrónimos

A lista que se apresenta em baixo contém o significado de várias abreviaturas e acrónimos em português e/ou inglês. A utilização do inglês prende-se com a ampla difusão de algumas destas abreviaturas, acrónimos e termos na comunidade científica, tornando difícil uma tradução literal para português.

Por uma questão de coerência com a maioria dos artigos publicados no âmbito deste trabalho, optou-se por utilizar nos termos em inglês a ortografia americana.

¹⁸ FDG-PET/CT	<i>2-[(18)E]fluoro-2-Deoxy-d-Glucose Positron-Emission Tomography/Computed Tomography</i>
AGES	<i>Age, tumor Grade, Extent and Size of primary tumor</i>
AKT1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 gene</i>
AMES	<i>Age, distant Metastases, Extent and Size of primary tumor</i>
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CAT	<i>Carcinoma Anaplásico da Tiroide</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CFT	<i>Carcinoma Folicular da Tiroide</i>
CPDT	<i>Carcinoma Pouco Diferenciado da Tiroide</i>
CPT	<i>Carcinoma Papilar da Tiroide</i>
CRM	<i>Certified Reference Material</i>
CT	<i>Tomografia Computadorizada (Computed Tomography)</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EMA	<i>Agência Europeia do Medicamento (European Medicines Agency)</i>
ESMO	<i>European Society of Medical Oncology</i>
ETA	<i>European Thyroid Association</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

Fw	<i><u>F</u>orward</i>
GAP	<i><u>G</u>TPase <u>A</u>ctivating <u>P</u>rotein</i>
GDP	<i><u>G</u>uanosine <u>d</u>iphosphate</i>
GTP	<i><u>G</u>uanosine 5'-<u>t</u>riphosphate</i>
HR	<i><u>H</u>azard <u>R</u>atio</i>
H-RAS	<i><u>H</u>arvey <u>R</u>at <u>S</u>arcoma gene</i>
IC	Intervalo de <u>C</u> onfiança
K-RAS	<i><u>K</u>irsten <u>R</u>at <u>S</u>arcoma gene</i>
LT4	Levotiroxina
MACIS	<i>distant <u>M</u>etastases, <u>A</u>ge, <u>C</u>ompleteness of surgery, <u>I</u>nvasion of extra-thyroidal tissues and <u>S</u>ize of the primary tumor</i>
MAPK	<i><u>M</u>itogen-<u>A</u>ctivated <u>P</u>rotein <u>K</u>inases</i>
NGS	Sequenciação de nova geração (<i><u>N</u>ext-<u>G</u>eneration <u>S</u>equencing</i>)
NIS	<i><u>N</u>atrium-<u>I</u>odide <u>S</u>ymporter</i>
N-RAS	<i><u>N</u>euroblastoma <u>R</u>at <u>S</u>arcoma gene</i>
NTCTCS	<i><u>N</u>ational <u>T</u>hyroid <u>C</u>ancer <u>T</u>reatment <u>C</u>ooperative <u>S</u>tudy</i>
OMS	<u>O</u> rganização <u>M</u> undial de <u>S</u> aúde
OR	<i><u>O</u>dds <u>R</u>atio</i>
OS	Sobrevivência global (<i><u>O</u>verall <u>S</u>urvival</i>)
PAX8	<i><u>P</u>aired box <u>8</u> gene</i>
PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>
PFS	Sobrevivência livre de progressão da doença (<i><u>P</u>rogression-<u>F</u>ree <u>S</u>urvival</i>)
PI3K	<i><u>P</u>hospho<u>I</u>nositide <u>3</u>-<u>K</u>inase</i>
PIK3CA	<i><u>P</u>hosphatidy<u>I</u>nositol-4,5-bisphosphate <u>3</u>-<u>K</u>inase, <u>C</u>atalytic subunit <u>A</u>lpha</i>
PPARG	<i><u>P</u>eroxisome <u>P</u>roliferative <u>A</u>ctivated <u>R</u>eceptor <u>G</u>amma gene</i>
PTEN	<i><u>P</u>hosphatase and <u>t</u>ensin homolog gene</i>
qPCR	<i>quantitative <u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>

RAS	<i><u>R</u>at <u>S</u>arcoma gene</i>
RET	<i><u>R</u>earranged <u>D</u>uring <u>T</u>ransfection</i>
rhTSH	<i>Tirotrofina humana recombinante (<u>r</u>ecombinant <u>h</u>uman <u>T</u>hyroid <u>S</u>timulating <u>H</u>ormone)</i>
RMN	<i><u>R</u>essonância <u>M</u>agnética <u>N</u>uclear</i>
RNA	<i><u>R</u>ibonucleic <u>A</u>cid</i>
ROC	<i><u>R</u>eceiver <u>O</u>perating <u>C</u>haracteristics</i>
RT-PCR	<i><u>R</u>eal-<u>T</u>ime <u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>
Rv	<i><u>R</u>everse</i>
SE	<i><u>S</u>tandard <u>E</u>rror</i>
SEER	<i><u>S</u>urveillance, <u>E</u>pidemiology and <u>E</u>nd <u>R</u>esults</i>
SPECT	<i><u>S</u>ingle <u>P</u>hoton <u>E</u>mission <u>C</u>omputed <u>T</u>omography</i>
TERT	<i><u>T</u>elomerase <u>R</u>everse <u>T</u>ranscriptase gene</i>
Tg	<i><u>T</u>iroglobulina</i>
TNM	<i><u>T</u>umor <u>N</u>ode <u>M</u>etastases</i>
TP53	<i><u>T</u>umor <u>P</u>rotein <u>p</u>53</i>
TRK	<i><u>N</u>eurotrophic <u>T</u>yrosine <u>K</u>inase Receptor gene</i>
UICC/AJCC	<i><u>U</u>nion <u>I</u>nternationale <u>C</u>ontre le <u>C</u>ancer/<u>A</u>merican <u>J</u>oint <u>C</u>ancer <u>C</u>ommittee</i>
VEGF	<i><u>V</u>ascular <u>E</u>ndothelial <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i>
VPN	<i><u>V</u>alor <u>P</u>reditivo <u>N</u>egativo</i>
VPP	<i><u>V</u>alor <u>P</u>reditivo <u>P</u>ositivo</i>
WT	<i><u>W</u>ild-<u>T</u>ype</i>

Índice

Publicações.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract	xi
Agradecimentos	xiii
Lista de abreviaturas e acrónimos	xv
Prefácio	xxi
1 – Introdução	1
1.1 – Classificação dos tumores da tiroide.....	1
1.2 – Epidemiologia.....	4
1.3 – Alterações moleculares nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular.....	6
1.3.1 – Mecanismos gerais de oncogénese e principais vias envolvidas	6
1.3.2 – Alterações moleculares mais frequentes	8
1.3.3 – Outras alterações moleculares.....	10
1.4 – Diagnóstico.....	11
1.4.1 – Dados clínicos	12
1.4.2 – Exames complementares de diagnóstico.....	12
1.5 – Princípios gerais do tratamento dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular.....	14
1.5.1 – Abordagem inicial.....	14
1.5.2. – Tratamento de recidivas e doença metastática	20
1.6 – Seguimento dos doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular	25
1.7 – Indicadores de prognóstico em carcinomas da tiroide de diferenciação folicular	27
1.7.1. – Marcadores clínicos e analíticos de prognóstico	28
1.7.2. – Marcadores histopatológicos de prognóstico.....	30
1.7.3. – Sistemas de estadiamento clínico-patológico.....	32
1.7.4. – Estratificação dinâmica do risco.....	34
1.7.5. – Marcadores moleculares de prognóstico.....	34
2. – Objetivos.....	37
3. – Material e Métodos.....	39
3.1. – Instituições envolvidas	39
3.2. – Amostra	40
3.3. – Métodos de investigação	40
3.3.1. – Estudo clínico e bioquímico.....	40
3.3.2. – Estudo anátomo-patológico (histológico)	43

3.3.3. – Estudo molecular.....	43
3.3.4. – Relação entre os fatores clínico-patológicos e moleculares com o prognóstico ...	45
3.3.5. – Análise estatística	45
4. – Resultados e discussão	47
4.1 – Valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com rhTSH e sua comparação com o valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com TSH endógena.....	47
Resultados	47
Discussão	53
4.2. – Valor preditivo de fatores clínico-patológicos e moleculares para metastização à distância, persistência de doença no final do seguimento e mortalidade específica.....	57
Resultados	58
4.2.1. – Fatores clínico-patológicos.....	58
4.2.2. – Mutações do <i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> na determinação do prognóstico	61
4.2.3. – Contribuição para o esclarecimento da oncobiologia dos carcinomas da tireoide de diferenciação folicular, através do estudo da frequência de uma nova alteração molecular presente nestes tumores, as mutações no promotor do <i>TERT</i>	68
4.2.4. – Mutações no promotor do <i>TERT</i> como indicadores de prognóstico	71
Discussão global	82
5. – Conclusões.....	93
6. – Perspetivas futuras.....	95
7. – Bibliografia.....	97
8. – Anexos	I
8.1. – Artigos	I
Artigo I.....	I
Artigo II.....	XVII
Artigo III.....	XXXI
Artigo IV.....	LXIII
Artigo V.....	LXXXI
8.2. – Licença de direitos de utilização de imagem.....	XCVI

Prefácio

A decisão de realizar este trabalho nasceu de vários desígnios, os quais se aliaram à oportunidade que surgiu ao longo do meu trajeto profissional. Uma das principais forças motivadoras foi o gosto pelo aperfeiçoamento profissional no exercício da medicina numa área pela qual nutro um gosto e um interesse particular. Para um médico, a descoberta e aquisição de novos conhecimentos tem por vezes a possibilidade de ter uma aplicação prática e quase imediata na melhoria dos cuidados prestados aos doentes, a qual constitui uma recompensa pessoal direta que poucas profissões são capazes de oferecer. Ao gosto pelo aperfeiçoamento profissional juntou-se a curiosidade científica, o gosto pela genética e biologia molecular, assim como a vontade de dar uma pequena contribuição para aumentar os conhecimentos na área que decidi estudar, numa perspetiva contínua e translacional: a de um clínico que acompanha o diagnóstico da doença, o subsequente tratamento e seguimento dos doentes e, em simultâneo, conhece e é capaz de executar trabalho laboratorial de investigação, cuja finalidade última é precisamente modificar a forma como o doente é diagnosticado, tratado e seguido.

A escolha do tema não foi difícil. O gosto pelas doenças da tiroide, em particular pelo cancro da tiroide, surgiu ao longo do Internato Complementar de Endocrinologia. Um dos fatores decisivos na gênese deste interesse foi a existência no Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos Hospitais da Universidade de Coimbra, onde realizei o Internato e posteriormente continuei a trabalhar como Assistente Hospitalar, de uma Consulta de Oncologia Tiroideia, especificamente dedicada ao tratamento e seguimento de doentes com esta patologia. A integração do Grupo de Estudo da Tiroide da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo desde cedo no decurso do Internato permitiu cultivar ainda mais o interesse, com oportunidade de ouvir opiniões de especialistas, não só dos centros mais importantes do país, como também de convidados afiliados aos principais centros internacionais. Ao mesmo tempo, as múltiplas publicações científicas e reuniões dinamizadas pelo Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), dedicado ao estudo do cancro, contribuiu para aumentar o interesse pela biologia e genética dos tumores da tiroide. Mais tarde, já especialista e como um dos elementos do corpo clínico da Consulta de Oncologia da Tiroide, senti a necessidade de conhecer melhor o comportamento biológico dos carcinomas de diferenciação folicular. Na prática clínica, a falta de bons indicadores de prognóstico que permitam aos clínicos individualizar o tratamento e seguimento dos doentes é sentida diariamente, numa patologia em que apenas 10-20% dos doentes vêm a apresentar doença clinicamente relevante de forma persistente ou recorrente, a qual pode vir a ser letal. Torna-se assim premente identificar o grupo de doentes em maior risco, tratando-os e seguindo-os de uma forma apropriada e, ao mesmo tempo, evitar procedimentos desnecessários e a iatrogenia que lhes é inerente no grupo maioritário de doentes com bom prognóstico. Face ao aprofundar de conhecimentos na área da oncobiologia e ao gosto pessoal por essa área, a decisão recaiu precisamente por estudar fatores clínico-patológicos e moleculares que possam constituir marcadores de prognóstico e seleção terapêutica.

A explosão de conhecimentos na área da oncobiologia interessou todos os clínicos que trabalham em oncologia, em particular aqueles que se interessam pela biologia molecular. No entanto, a comunicação entre os dois mundos – ciência fundamental ou básica e clínica – não é

fácil. Os clínicos sentem dificuldade em compreender e aplicar na prática os conhecimentos veiculados pela investigação fundamental, desconhecendo muitas vezes as dificuldades do trabalho laboratorial e as vicissitudes que lhe são inerentes. Por outro lado, os cientistas fundamentais têm dificuldade em abranger as múltiplas variáveis consideradas no processo de decisão clínica, as quais podem constituir obstáculos à aplicação prática dos novos conhecimentos. Esta dificuldade é reconhecida pela comunidade científica internacional, multiplicando-se as publicações, reuniões científicas e mesmo a constituição de instituições cujo objetivo último é a translação, ou seja, a «tradução» do conhecimento bidirecional entre a ciência básica e clínica. Apesar de não ter sido totalmente consciente, penso que este trabalho veio ao encontro do desafio translacional, contribuindo para trazer um pouco da clínica ao laboratório e um pouco do laboratório à clínica.

Neste contexto, de entre as múltiplas possibilidades com que me deparei, propus-me elaborar um trabalho com uma vertente mais clínica e outra mais translacional. Na vertente clínica, a utilização recente da TSH humana recombinante (rhTSH) na preparação da ablação inviabilizava a determinação dos níveis da tiroglobulina estimulada no momento da ablação nos moldes em que os clínicos estavam habituados a valorizá-la - antes da administração do ¹³¹I. Conhecendo-se o valor prognóstico da tiroglobulina neste momento estimulada pela TSH endógena, questionei-me se o doseamento também teria valor prognóstico quando se utiliza a TSH recombinante. Na vertente translacional, pretendi ajudar a clarificar o valor prognóstico das mutações do *BRAF* e *NRAS* em doentes com carcinomas diferenciados da tiroide. No decurso deste trabalho, foi descrita a existência de mutações no promotor do *TERT* em melanomas. Sabendo-se que os melanomas e os carcinomas da tiroide de diferenciação folicular partilham algumas alterações genéticas, como as mutações do *BRAF*, o grupo de investigação ao qual pertenceo e no âmbito do qual realizei este trabalho propôs-se estudar a frequência das mutações no promotor do *TERT* em carcinomas da tiroide. A pesquisa destas mutações e posterior estudo da sua associação com as características clínico-patológicas e prognóstico dos doentes constituíram uma parte fundamental do trabalho realizado no âmbito desta Tese.

1 – Introdução

Os carcinomas da tiroide de diferenciação folicular representam um desafio no que diz respeito à determinação do prognóstico dos doentes. Na verdade, este grupo engloba desde uma das neoplasias malignas humanas com menor mortalidade – o carcinoma papilar da tiroide – até uma das clinicamente mais agressivas – o carcinoma indiferenciado ou anaplásico.

Nos últimos anos, a incidência de carcinomas diferenciados da tiroide tem aumentado de uma forma relevante, em particular nos países ocidentais (1, 2). A grande maioria dos novos carcinomas diagnosticados são tumores de baixo risco ou muito baixo risco e têm um prognóstico excelente (3). Este facto contribui para a necessidade de estabelecer bons critérios de prognóstico e seleção terapêutica, permitindo tratar de um modo adequado os doentes com formas clinicamente mais agressivas, assim como evitar uma morbilidade terapêutica importante e desnecessária em doentes com tumores que não terão um comportamento agressivo.

1.1 – Classificação dos tumores da tiroide

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (4), os tumores malignos da tiroide são classificados como enunciado na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação dos tumores malignos da tiroide

Tumores malignos primários
Tumores malignos derivados do epitélio folicular
Carcinoma papilar
Carcinoma folicular
Carcinoma pouco diferenciado
Carcinoma indiferenciado ou anaplásico
Tumores malignos com origem nas células C
Carcinoma medular
Tumores malignos mistos foliculares e de células C
Outros tumores malignos epiteliais
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma mucoepidermóide
Carcinoma com células fusiformes e de diferenciação tímica
Tumores malignos não-epiteliais
Linfoma
Sarcoma

Adaptado de (4) – WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon: IARC Press.

Os tumores malignos derivados do epitélio folicular da tiroide, principal tema de estudo desta tese, são o carcinoma papilar, o carcinoma folicular, o carcinoma pouco diferenciado e o carcinoma indiferenciado ou anaplásico.

Consideram-se como carcinomas diferenciados da tiroide o carcinoma papilar e o carcinoma folicular. Apesar do carcinoma papilar e do carcinoma folicular apresentarem algumas diferenças relevantes em termos etiológicos, epidemiológicos e de comportamento biológico (adiante mencionadas), a apresentação clínica, tratamento e prognóstico ajustado ao estágio são semelhantes para estes dois tipos de tumores (5), o que leva a que sejam tratados em conjunto na maior parte das recomendações clínicas referentes ao tratamento e seguimento de doentes com estas neoplasias (6-8). De uma forma geral o prognóstico dos carcinomas diferenciados da tiroide pode ser considerado bom, com uma probabilidade de sobrevivência aos 10 anos de 90-98% (5, 9, 10). No entanto, algumas variantes do carcinoma papilar apresentam um prognóstico pior, assim como as variantes mais invasivas do carcinoma folicular.

A apresentação clínica mais frequente dos carcinomas diferenciados da tiroide consiste na deteção de um nódulo cervical na região tiroideia, que na maior parte dos casos é de consistência duro-elástica e móvel. O diagnóstico pode também ser feito após a deteção de uma tumefação latero-cervical, a qual corresponde a metastização ganglionar loco-regional. Numa minoria dos doentes podem estar presentes outros sintomas locais como desconforto, disfagia e/ou disфонia. O número de doentes a quem um carcinoma diferenciado é diagnosticado por queixas condicionadas por metástases à distância é reduzido (0,5-2,2%) (11, 12). Um número crescente de carcinomas diferenciados da tiroide (cerca de 20% nas séries mais recentes), em particular microcarcinomas papilares (carcinomas com dimensão inferior a 1 cm), são detetados acidentalmente aquando da realização de um procedimento imagiológico não dirigido à tiroide (6, 11); outros são detetados no estudo histológico após uma cirurgia tiroideia por patologia benigna.

O carcinoma papilar da tiroide é o mais frequente, representando atualmente entre 80-90% do total de novos casos de carcinoma da tiroide (9, 11). Para além da diferenciação folicular, é caracterizado pela presença de alterações nucleares típicas: os núcleos são grandes e assimétricos, com bordos irregulares e por vezes sobrepostos (núcleos em grão de café), apresentando cromatina hipodensa (núcleos em vidro fosco), fendas e pseudo-inclusões. Em 20-80% dos casos são tumores multifocais, sendo esta diferença na frequência da multifocalidade atribuída sobretudo à meticulosidade com que é realizado o estudo histológico (13). O padrão de crescimento é variável e está na base da definição das 16 variantes histológicas reconhecidas pela OMS. Se excluirmos os microcarcinomas papilares, que por definição medem menos de 1 cm e são encontrados acidentalmente, as duas variantes histológicas mais frequentes são o carcinoma papilar da tiroide clássico e a variante folicular do carcinoma papilar da tiroide (4). Para além da diferença no padrão de crescimento, estas duas variantes também apresentam alterações moleculares distintas e comportamento biológico diferente. O carcinoma papilar clássico apresenta predominantemente um crescimento infiltrativo, com arquitetura papilar ou mista papilar/folicular, com corpos psamomatosos e, por vezes, com formação de quistos. A variante folicular do carcinoma papilar caracteriza-se por uma arquitetura folicular (por definição deverão ter mais de 95% de folículos), podendo ser composta por folículos de tamanho médio ou grande; pode ser encapsulada ou infiltrativa. De entre as variantes histológicas do carcinoma papilar associadas a um pior prognóstico, salientam-se a variante de células altas, a variante de células colunares e a variante esclerosante difusa. O carcinoma papilar metastiza frequentemente para os gânglios linfáticos cervicais, reportando-se uma frequência de metástases ganglionares entre 20-90%, a qual varia fundamentalmente em função da extensão

do esvaziamento ganglionar realizado (14). As metástases à distância surgem em até 15% dos doentes e têm como localizações mais frequentes o pulmão e o osso (15). As alterações moleculares mais frequentes nos carcinomas papilares ocorrem em elementos da via das MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) e incluem mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS*, assim como rearranjos envolvendo os genes *RET* e *NTRK* (16, 17).

O carcinoma folicular da tireoide é um tumor invasivo encapsulado, de diferenciação folicular, no qual as características nucleares típicas do carcinoma papilar estão ausentes (4). Representa cerca de 5-10% das neoplasias da tireoide diagnosticadas na atualidade (11, 18). Afeta sobretudo mulheres com mais de 50 anos, sendo raro na infância. O carcinoma folicular surge por vezes no contexto de um bócio multinodular e parece estar associado a um baixo aporte alimentar de iodo (19). Sob o ponto de vista morfológico, é frequente a formação de folículos, os quais são muitas vezes atípicos; por vezes existem múltiplos padrões morfológicos no mesmo tumor. O caráter invasivo e maligno destes tumores é afirmado pela presença de invasão da cápsula do tumor e/ou de invasão vascular. Os carcinomas foliculares são classificados como minimamente invasivos ou extensamente invasivos. Os primeiros caracterizam-se pela presença de pequenos focos de invasão da cápsula e/ou vascular, esta última geralmente na periferia do tumor. Os segundos são mais raros e apresentam uma invasão marcada dos tecidos adjacentes ao tumor, assim como de múltiplos vasos, alguns de calibre considerável. Ao contrário do carcinoma papilar, raramente é multifocal e a metastização ganglionar é pouco frequente. A metastização à distância, fundamentalmente para o pulmão e para o osso, ocorre predominantemente nos tumores extensamente invasivos ou angioinvasivos (20). As alterações moleculares mais frequentes nestes tumores incluem mutações pontuais do *RAS* e rearranjos dos genes *PAX8/PPAR γ* .

O diagnóstico diferencial entre um adenoma folicular e um carcinoma folicular baseia-se assim na presença de invasão da cápsula e/ou vascular; por definição, um adenoma folicular é um tumor encapsulado benigno de diferenciação folicular, na qual as invasões anteriormente referidas estão ausentes e que não apresenta características nucleares típicas do carcinoma papilar. Se existirem dúvidas relativas à caracterização dos núcleos como sendo típicos de carcinoma papilar ou quando as alterações nucleares apenas estão presentes de uma forma focal, pode ser difícil estabelecer um diagnóstico definitivo relativo à malignidade de uma lesão folicular; nestas circunstâncias, é aconselhada por alguns autores a denominação de «tumor bem diferenciado de potencial maligno incerto» (4, 21). Um problema semelhante coloca-se perante uma neoplasia folicular encapsulada com características invasivas, na qual as alterações nucleares típicas do carcinoma papilar são dúbias ou estão presentes apenas de uma forma focal; neste caso, recomenda-se a denominação de «carcinoma bem diferenciado sem outra especificação» (4, 21).

A categoria «carcinoma pouco diferenciado da tireoide» inclui tumores derivados do epitélio folicular que apresentam características morfológicas e biológicas distintas dos carcinomas diferenciados (carcinoma papilar e carcinoma folicular) e do carcinoma indiferenciado (4). Representa entre 2-4% de todos os carcinomas da tireoide (22) e é um grupo heterogêneo, englobando tumores produtores de tiroglobulina que apresentam um padrão de crescimento

sólido, trabecular ou insular na maior parte do tumor (23) associado à presença de mitoses e áreas de necrose. Trata-se de um tumor que surge predominantemente em pessoas idosas, com frequente metastização loco-regional e à distância, estando associado a mau prognóstico (24).

Em todas as categorias anteriormente referidas (carcinoma papilar, carcinoma folicular e carcinoma pouco diferenciado) existe um grupo de tumores que se caracteriza por serem constituídos predominantemente por células com citoplasma abundante e eosinofílico, denominadas células de Hürthle ou oncocíticas. Esta característica histológica é provocada pela acumulação pronunciada de mitocôndrias com anomalias estruturais no citoplasma destas células (25). As variantes oncocíticas do carcinoma papilar, do carcinoma folicular (também designado por carcinoma folicular oncocítico) e do carcinoma pouco diferenciado possuem um comportamento biológico semelhante ao das variantes não oncocíticas do grupo histológico respetivo (26).

O carcinoma indiferenciado ou anaplásico da tiroide é um dos tumores humanos com maior agressividade. Trata-se de uma neoplasia que atinge doentes idosos, sobretudo na sétima década de vida, que se caracteriza por invasão extensa das estruturas peri-tiroideias, nomeadamente a via aérea e os grandes vasos cervicais. Sob o ponto de vista histológico, caracteriza-se por células fusiformes, poligonais ou gigantes, sendo muito frequentes as mitoses (por vezes atípicas) e a necrose extensa (4). O prognóstico dos doentes é muito reservado, com uma mediana de sobrevivência de 5-6 meses e uma sobrevivência um ano após o diagnóstico de 20% (27, 28).

Quer o carcinoma pouco diferenciado quer o carcinoma indiferenciado partilham alterações moleculares com o carcinoma papilar (*BRAF* e *RAS*) e com o carcinoma folicular (*RAS*), mas frequentemente coexistem outras alterações moleculares envolvendo sobretudo elementos da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/AKT (*PIK3CA* e *AKT1*) (22, 29). O facto de partilharem alterações moleculares parece indicar que pelo menos uma parte dos carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados terá origem em carcinomas diferenciados, hipótese que é corroborada pela coexistência em alguns tumores de áreas com morfologia diferenciada e áreas com morfologia indiferenciada. A alteração molecular mais frequente no carcinoma indiferenciado é a mutação do *TP53*.

1.2 – Epidemiologia

Apesar de apenas cerca de 5% dos nódulos da tiroide serem malignos (6), o cancro da tiroide é a neoplasia endócrina mais frequente. Os cancros da tiroide clinicamente evidentes são responsáveis por 2-4% do total de neoplasias malignas em Portugal (30) e noutros países desenvolvidos (31). No entanto, a verdadeira epidemiologia dos carcinomas da tiroide é difícil de estabelecer, uma vez que existe um número significativo de tumores subclínicos (discutido em baixo).

Os carcinomas derivados do epitélio folicular são duas a quatro vezes mais frequentes no género feminino do que no masculino. A frequência aumenta progressivamente com a idade, sendo raro e exclusivamente limitado ao carcinoma papilar antes dos 10 anos, apresentando uma mediana da idade na altura do diagnóstico entre os 45 e os 50 anos. Enquanto nas mulheres a

incidência aumenta com a idade a partir dos 16 anos e até aos 40, entrando depois em *plateau*, no homem continua a aumentar progressivamente até aos 80 anos.

Desde 1980 que a incidência de cancro diferenciado da tiroide tem aumentado progressivamente em todos os continentes, com exceção do continente africano, sobretudo no género feminino (3). Na Tabela 2 apresenta-se a variação da incidência de cancro da tiroide em Portugal e nos Estados Unidos da América. Este aumento da incidência diz respeito a tumores de todas as dimensões, mas é muito mais pronunciado no grupo de tumores com menos de 2 cm, chegando os tumores com menos de 1 cm a representar 40% do total de novos casos em alguns países industrializados (1, 3, 11, 32). O aumento da incidência parece ser maior em mulheres – triplicou nos últimos 30 anos, enquanto nos homens apenas duplicou – e não foi acompanhado por um aumento da mortalidade (1, 33, 34). Um dos fatores responsáveis por este aparente aumento na incidência poderá ser uma melhoria nos registos oncológicos. No entanto, o principal fator responsável parece ser a melhoria na metodologia de diagnóstico [ecografia cervical, tomografia por emissão de positrões com ¹⁸Fluor-Desoxi-Glicose (¹⁸FDG-PET/CT) e citologia aspirativa com agulha fina] e na acessibilidade aos cuidados de saúde. Estudos de séries de autópsias demonstraram que o número de carcinomas papilares ocultos pode atingir os 36% (35) da população, enquanto que o estudo histológico de peças de tireoidectomias realizadas por condições benignas revelou uma frequência que pode atingir os 24% (6). Sabe-se também que a grande maioria dos carcinomas pequenos não progride com o tempo, podendo permanecer por diagnosticar se não for pesquisada ativamente. Dois estudos demonstraram que apenas 6% dos microcarcinomas crescem mais de 3 mm aos 5 anos de seguimento (36) e apenas 8% crescem mais de 3 mm aos 10 anos de seguimento (37). Assim, podemos dizer que há um reservatório de carcinomas subclínicos, os quais têm vindo a ser progressivamente detetados com a melhoria da metodologia de diagnóstico, em particular da imagiologia, devendo-se a maior parte do aumento da incidência à deteção aumentada dos tumores de pequena dimensão (38). Esta justificação é corroborada por estudos que mostraram uma correlação positiva entre a incidência de cancro da tiroide e o nível socioeconómico da população estudada, sobretudo no que diz respeito ao acesso aos cuidados de saúde (33, 34, 39). No entanto, o número de carcinomas da tiroide de maior tamanho também aumentou, embora de uma forma muito menos pronunciada (3). Desta forma, apesar de ser reconhecido de forma consensual que a maior proporção do aumento da incidência se deve à deteção de pequenos carcinomas subclínicos, permanece por esclarecer se paralelamente estará a ocorrer um aumento real na incidência, devido a mecanismos ainda não esclarecidos.

O aumento da incidência verificado nas últimas décadas fez-se sobretudo à custa do histotipo papilar, tendo o carcinoma folicular reduzido a sua frequência relativa (11). Uma dos fatores responsáveis por esta alteração terá sido a revisão da classificação da OMS em 1988, a qual levou a que um número significativo de tumores anteriormente classificados como carcinomas foliculares passassem a ser classificados como variantes foliculares do carcinoma papilar (6). O aumento da ingestão de iodo que ocorreu de uma forma geral nos países desenvolvidos pode ser outro fator, uma vez que é conhecida a associação do carcinoma folicular com a carência de iodo e a do carcinoma papilar com o aumento da ingestão de iodo (19). Outros agentes ambientais ainda não identificados poderão também ser responsáveis por esta alteração.

Sob o ponto de vista clínico, o aumento da incidência, feito sobretudo à custa de tumores pequenos com bom prognóstico, suscita problemas relacionados com as orientações de tratamento e seguimento, as quais foram desenhadas e implementadas para o tratamento de tumores potencialmente mais agressivos. Este aspeto reforça ainda mais a necessidade urgente de bons marcadores de prognóstico e seleção terapêutica.

Tabela 2 - Incidência do carcinoma da tiroide por 100 000 habitantes em Portugal e nos Estados Unidos da América (EUA) (30, 40, 41)

Portugal			EUA		
Ano	Homens	Mulheres	Total	Ano	Total
2001	2,5	10,5	6,6	2002	8,3
2007	4,6	18,0	11,5	2007	12,4

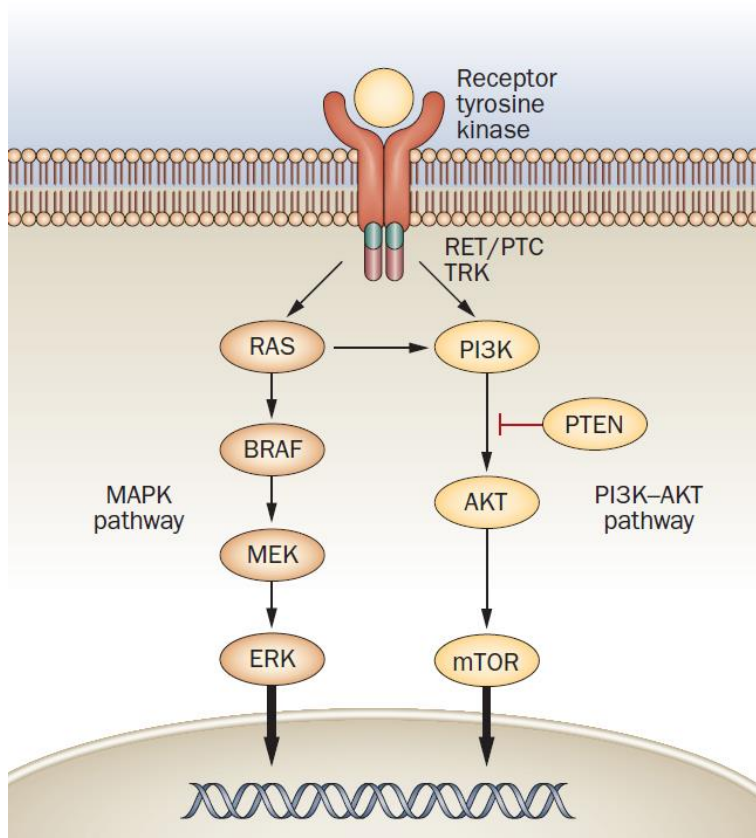
1.3 – Alterações moleculares nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular

1.3.1 – Mecanismos gerais de oncogénese e principais vias envolvidas

Tal como noutros modelos tumorais, a oncogénese dos carcinomas da tiroide parece resultar de um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas sofridas pelas células foliculares, as quais vão conferir vantagens em termos de potencial de crescimento e aquisição de novas competências, nomeadamente de invasibilidade, cujo resultado final consiste na transformação neoplásica. As alterações moleculares vão consistir em mutações somáticas ativadoras ou inativadoras, desregulação dos microRNA e metilação aberrante de genes, entre outras, cujo resultado final consiste na ativação aberrante ou sobre-expressão de genes que promovem a proliferação ou inibem a apoptose (proto-oncogenes e genes anti-apoptóticos); o resultado das alterações moleculares pode também ser a inativação ou a subregulação/silenciamento de genes que inibem a proliferação ou que detetam e reparam lesões no DNA (genes supressores tumorais, genes pró-apoptóticos e genes de reparação de DNA).

O correto funcionamento e homeostasia celulares são assegurados por complexas vias de sinalização, que integram múltiplos estímulos intra e extracelulares, com vista a regularem fenómenos como a proliferação celular, o metabolismo, a diferenciação, a apoptose, a motilidade e a invasibilidade. A maior parte das alterações moleculares já descritas na literatura são mutações somáticas (mutações pontuais ou rearranjos cromossómicos) que envolvem duas destas vias – a via MAPK e a via PI3K/AKT – e resultam na sua ativação aberrante (Figura 1). Na Tabela 3 enumeram-se as alterações moleculares mais frequentes nos carcinomas da tiroide derivados do epitélio folicular, de acordo com o tipo histológico.

Figura 1 - Principais vias de sinalização envolvidas na carcinogênese tiroideia (MAPK e PI3K-AKT) (figura reproduzida com autorização da referência (29))



A via MAPK (ou das MAPK/ERK – cinases de proteínas ativadas por mitogénios/cinases reguladas por sinais extracelulares) é uma via de sinalização clássica que transmite sinais a partir do meio extracelular (através de recetores membranares), os quais vão regular a proliferação celular, a diferenciação, a apoptose e a sobrevivência (42). A presença de uma alteração molecular que origine a ativação constitutiva desta via vai alterar o fenótipo das células, promovendo a proliferação e a desdiferenciação e inibindo a apoptose (43). Na oncogénese tiroideia, a ativação desta via parece também condicionar uma série de alterações secundárias que vão potenciar e amplificar a atividade oncogénica, como por exemplo alterações no padrão de metilação do genoma (44). As alterações moleculares mais frequentes nos carcinomas diferenciados da tiroide envolvem elementos desta via, nomeadamente os genes *BRAF*, *RAS* e *RET* (17, 29). De salientar que raramente coexistem alterações moleculares em dois genes desta via, parecendo assim que a alteração de um deles é suficiente para promover a oncogénese (45).

A via PI3K/AKT está também envolvida na regulação de um número significativo de funções celulares, incluindo o crescimento, proliferação, metabolismo e sobrevivência (46). O papel fisiológico desta via apresenta semelhanças com a via MAPK, uma vez que não só ambas podem ser ativadas por estímulos extracelulares que atuam em recetores membranares, como também vão regular em conjunto mecanismos fulcrais como a proliferação e a sobrevivência. Para além disso, existe uma comunicação estreita entre as duas vias (43, 47). Na oncogénese tiroideia, as alterações moleculares envolvendo elementos da via PI3K/AKT são menos frequentes do que as alterações da via MAPK, surgindo em formas mais avançadas da doença (carcinomas pouco

diferenciados e anaplásicos), onde muitas vezes coexistem com mutações dos genes *BRAF* e *RAS* (22, 48). Os principais genes envolvidos são o *PIK3CA*, *AKT1* e *PTEN* (17, 29).

Tabela 3 - Frequência das principais alterações moleculares em carcinomas da tireoide de diferenciação folicular, de acordo com o tipo histológico.

Carcinoma papilar	Carcinoma folicular	Carcinoma pouco diferenciado	Carcinoma anaplásico
<i>BRAF</i> (40-45%)	<i>RAS</i> (30-50%)	<i>RAS</i> (20-40%)	<i>TP53</i> (50-80%)
<i>RAS</i> (10-20%)	<i>PAX8/PPARγ</i> (30-35%)	<i>TP53</i> (20-30%)	<i>RAS</i> (20-40%)
<i>RET/PTC</i> (10-20%)	<i>PIK3CA</i> (<10%)	<i>BRAF</i> (10-20%)	<i>BRAF</i> (20-40%)
<i>TRK</i> (<5%)	<i>PTEN</i> (<15%)	<i>PIK3CA</i> (5-10%)	<i>PIK3CA</i> (10-20%)
		<i>AKT1</i> (5-10%)	<i>PTEN</i> (5-20%)
			<i>AKT1</i> (5-10%)

Hanahan & Weinberg descreveram um conjunto de propriedades como sendo essenciais para as células neoplásicas: a autossuficiência em fatores de crescimento, o escape à apoptose, a insensibilidade a fatores inibidores do crescimento, a capacidade invasora e metastática, a capacidade angiogénica e a capacidade proliferativa ilimitada. Numa segunda publicação, acrescentaram duas propriedades adicionais: a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imunológica. (49). Pensa-se que na base destas propriedades estarão a instabilidade genómica com ocorrência de mutações, assim como a inflamação local promovida pelo tumor gerando um microambiente específico. Apesar da ativação das vias MAPK e PI3K/AKT indiretamente interferir com vários destes fatores essenciais para a oncogénese, muito permanece por descobrir no que diz respeito à base molecular responsável por estes mecanismos na oncogénese tiroideia.

Muito recentemente, a utilização da sequenciação sistemática do genoma tumoral através da sequenciação de nova geração (NGS – *Next-Generation Sequencing*) levou ao reconhecimento de um número elevado de genes mutados que contribuem para o desenvolvimento e progressão tumoral (50). A maior parte destas mutações somáticas ocorrem em regiões codificantes, mas foram também descritas em menor número algumas mutações nas regiões reguladoras da expressão génica. Entre estas, salientam-se as mutações no promotor da *TERT*, descritas em melanomas e que poderão contribuir para a manutenção da imortalidade replicativa das células tumorais (51, 52).

1.3.2 – Alterações moleculares mais frequentes

As alterações moleculares mais frequentes nos carcinomas da tireoide de diferenciação folicular consistem em mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS*, assim como rearranjos cromossómicos envolvendo os genes *RET* e *PAX8/PPAR γ* .

1.3.2.1 – *BRAF*

A proteína *BRAF* é uma cinase de resíduos serina-treonina, a qual é translocada para a membrana depois de ser ativada pela *RAS*, resultando na fosforilação e ativação de elementos

a jusante na via das MAPK (figura 1). Nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular, o mecanismo mais frequente na origem da ativação desta cinase consiste na mutação pontual que substitui uma timina por uma adenina na posição 1799, a qual vai resultar na substituição de uma valina por glutamato na posição 600 (mutação V600E) (45). Para além da mutação pontual anteriormente referida, a qual representa 98-99% de todas as mutações do *BRAF* encontradas em neoplasias da tiroide, podem ainda estar presentes mutações pontuais na posição 601 (substituição de lisina por glutamato), várias inserções ou deleções envolvendo o codão 600, ou mesmo um rearranjo envolvendo os genes *AKAP9/BRAF* (53). A mutação do *BRAF* é capaz de induzir transformação neoplásica na tiroide de ratinhos transgênicos (54). Um estudo recente mostrou a presença de heterogeneidade intratumoral em tumores humanos, estando em alguns casos a mutação presente numa percentagem relativamente pequena das células tumorais (55). Estes dados e a associação da mutação *BRAF* V600E a doentes de idade avançada e a sua baixa frequência em jovens colocaram em causa o papel da mutação como evento inicial na oncogénese, levantando a hipótese da mutação poder ser um evento secundário adquirido pelas células ao longo do processo oncogénico. Apesar de outro estudo subsequente, utilizando uma metodologia mais sensível para a deteção de mutações (NGS), ter reportado a presença da mutação do *BRAF* na grande maioria das células tumorais (56), permanece em aberto a discussão sobre o verdadeiro papel da mutação deste gene na oncogénese tiroideia.

A mutação do *BRAF* V600E é a alteração molecular mais frequente no carcinoma papilar da tiroide, onde está presente em cerca de 40-45% dos casos. Esta mutação é sobretudo prevalente na forma clássica (45%) e na variante de células altas (80%), sendo muito menos frequente na variante folicular (15%) (17, 57); nesta última, a mutação do *BRAF* está sobretudo presente nos tumores infiltrativos não capsulados (58). A mutação V600E também é encontrada com menor frequência nos carcinomas pouco diferenciados (10-20%) e indiferenciados (20-40%), sendo este um dos argumentos utilizados para apontar a mutação do *BRAF* como um evento inicial nos carcinomas papilares, alguns dos quais poderão por perda de diferenciação originar tumores mais agressivos. Esta mutação não foi até hoje descrita em carcinomas foliculares, nem em lesões benignas da tiroide.

Alguns estudos mostraram uma associação entre a presença da mutação do *BRAF* e a menor expressão de genes envolvidos no metabolismo do iodo e na síntese das hormonas tiroideias (59, 60). Uma vez que este aspeto pode ter implicações diretas na resposta ao tratamento com ¹³¹I e no prognóstico dos doentes, optou-se por o debater em conjunto com as características clínico-patológicas no capítulo «Marcadores moleculares de prognóstico».

1.3.2.2 – RAS

As mutações em genes da família *RAS* (*NRAS*, *HRAS* e *KRAS*) são as segundas mais frequentes nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular. Estes genes codificam uma família de proteínas ligadas à superfície interna da membrana celular, as quais são ativadas por recetores de membrana com atividade tirosina-cinase ou acoplados à proteína G, transmitindo a sinalização intracelular subsequente através das vias MAPK e PI3K/AKT, entre outras. As proteínas *RAS* possuem atividade GTPase intrínseca, estabilizada e potenciada por uma GAP (*GTPase activating protein*), a RASGAP, sendo a hidrólise do GTP o mecanismo responsável pela transformação da forma ativa da *RAS* (ligada ao GTP) na forma inativa (ligada ao GDP). As mutações do *RAS* provocam a perda da sua atividade GTPase, bloqueando a proteína na forma

constitutiva ativa ligada ao GTP. Nos carcinomas da tireoide, a isoforma predominantemente mutada é a *NRAS*, envolvendo sobretudo o codão 61.

As mutações do *RAS* estão presentes em 30-50% dos carcinomas foliculares e em 10-20% dos carcinomas papilares, encontrando-se fundamentalmente na variante folicular deste último (30-45%) (17, 29). Existe assim uma clara associação entre as mutações deste gene e a morfologia folicular. As mutações do *RAS* estão também presentes em 20-40% dos carcinomas pouco diferenciados e 20-40% dos anaplásicos. Ao contrário das mutações do *BRAF*, foram também encontradas mutações do *RAS* em lesões benignas, estando presentes em 20-40% dos adenomas foliculares (29). Este achado favorece a ideia de que a mutação do *RAS* poderá ser um evento precoce na oncogénese tiroideia, podendo não ser suficiente para induzir transformação maligna. Esta hipótese é corroborada por estudos realizados em ratinhos transgênicos, nos quais a expressão condicionada do *RAS* mutado na tiroide não foi capaz por si só de induzir transformação maligna, sendo necessárias alterações genéticas adicionais, como a deleção do *PTEN* (61).

1.3.3 – Outras alterações moleculares

O rearranjo *RET/PTC* é uma alteração encontrada no carcinoma papilar da tiroide. Existem mais de dez rearranjos *RET/PTC*, sendo os mais frequentes os *RET/PTC1* e *RET/PTC3* (45). Todas as translocações originam genes quiméricos que contêm intacta a porção do *RET* que codifica o domínio com atividade cinase de tirosina fundida com a região promotora e regiões de dimerização proteica de outro gene ubiquitário, o qual vai originar a expressão e a dimerização independente do ligando da proteína *RET/PTC*, a qual leva à estimulação crónica da via das *MAPK* e à carcinogénese nas células tiroideias (62). Tal como outros rearranjos cromossómicos, o *RET/PTC* foi associado à exposição a radiações ionizantes, as quais podem provocar quebras na dupla cadeia de DNA (63). Em tumores derivados das células foliculares, o rearranjo *RET/PTC* é encontrado no carcinoma papilar, em particular na forma clássica. A ausência deste rearranjo nas formas indiferenciadas parece apontar para a manutenção da diferenciação dos carcinomas papilares que apresentem *RET/PTC* ao longo da sua história natural. O rearranjo foi também encontrado em lesões benignas tumorais (adenomas foliculares) e não-tumorais (tiroidites) (64).

O rearranjo *PAX8/PPARG* é uma alteração frequente em carcinomas foliculares (30-35%). A fusão origina sobre-expressão acentuada da proteína quimérica, mas os mecanismos que justificam o seu papel na eventual transformação neoplásica permanecem por esclarecer (65). O rearranjo também foi encontrado de forma menos frequente na variante folicular do carcinoma papilar (5-35%), assim como em adenomas foliculares (2-30%) (29, 66).

A maioria das outras alterações moleculares descritas nos carcinomas da tiroide de origem folicular estão relacionadas com a perda de diferenciação e com um comportamento clínico mais agressivo. Nestes tumores encontram-se mutações na via *PI3K/AKT*, nomeadamente nos genes *PIK3CA*, *AKT1* e *PTEN* (47). No caso do *PTEN*, que exerce uma função reguladora da ativação desta via reduzindo a sua atividade, o silenciamento do gene através da metilação do promotor parece ser mais frequente do que a mutação somática inativadora da sua função (47). Outro regulador da via *PI3K/AKT* (e também da via *MAPK*) cuja função parece estar comprometida por mutação somática ou silenciamento epigenético é o *RASAL1* (67). No caso

dos carcinomas indiferenciados, a alteração molecular mais frequente é a mutação pontual do gene *TP53* (50-80%), a qual condiciona perda de função deste importante supressor tumoral (22). Outro gene por vezes mutado nos carcinomas indiferenciados é o *CTNNB1*, que codifica a β -catenina e está envolvido na adesão celular e sinalização através da via Wnt (29).

A nível epigenético, foram reportadas alterações na expressão de vários genes, nomeadamente subexpressão por hipermetilação dos promotores; são exemplos os genes *TIMP3* (*tissue inhibitor of metalloproteinases 3*), *DAPK1* (*death-associated protein kinase 1*), *RARB* (*retinoic acid receptor- β*), *SCL5A8* e *SCL5A5* (17). Este último codifica o simportador de sódio e iodo (NIS) responsável pela captação deste oligoelemento pelas células foliculares da tiroide. Dada a sua relevância em termos terapêuticos, será objeto de uma discussão particular nos capítulos «Princípios gerais do tratamento dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular» e «Marcadores moleculares de prognóstico».

No caso dos tumores oncocíticos ou de células de Hürthle, parecem existir alterações genéticas específicas responsáveis por este fenótipo, as quais se podem ou não sobrepor às alterações características do tipo histológico de base (por exemplo, mutação do *BRAF* na variante oncocítica do carcinoma papilar e do *RAS* na variante oncocítica do carcinoma folicular). As alterações genéticas adicionais podem ocorrer quer no DNA mitocondrial (caso da deleção comum mitocondrial ou de mutações em genes que codificam o complexo I da fosforilação oxidativa), quer em genes do DNA nuclear que codificam proteínas mitocondriais (genes *GRIM-19* e *TIMM44*) (26).

1.4 – Diagnóstico

A maioria dos carcinomas diferenciados da tiroide apresenta-se clinicamente como um nódulo cervical na região tiroideia. No entanto, os nódulos da tiroide são muito prevalentes na população em geral, sendo detetados à palpação em 3-7% da população geral (68) e por ecografia em 20-60% (69); em séries de autópsias, foi reportada uma prevalência de até 76% (70). A patologia nodular da tiroide é mais frequente em mulheres, na população idosa e em regiões com deficiência de iodo. Apenas 5-15% dos nódulos tiroideus correspondem a neoplasias malignas, variando esta percentagem em função do género, idade, história familiar de carcinoma e antecedentes de exposição a radiações ionizantes, entre outros (6). Neste contexto, a investigação clínica tem como objetivo principal a exclusão de malignidade.

No que diz respeito aos antecedentes familiares, ressalva-se que os carcinomas da tiroide de diferenciação folicular possuem uma forte agregação familiar, sendo o risco relativo de um familiar em primeiro grau de um indivíduo afetado mais elevado do que o conferido por algumas síndromes genéticas com hereditariedade mendeliana estabelecida (por exemplo, síndrome do cancro da mama e ovário ligado a mutações do *BRCA*) (71). O risco relativo de um familiar em primeiro grau de um doente com carcinoma da tiroide de diferenciação folicular desenvolver a doença está 5,2-9,5 vezes aumentado quando comparado com a população geral; no caso de existirem dois familiares em primeiro grau afetados (um dos pais e um irmão), o risco relativo está aumentado 292 vezes (72).

De salientar que, fruto da disseminação dos exames complementares imagiológicos, um número progressivamente maior de nódulos da tiroide são diagnosticados aquando da realização de um exame imagiológico (ecografia, TC ou RMN) dirigido a outro órgão ou sistema. Estas lesões são geralmente designadas como «incidentalomas» ou «acidentalomas» e são na maior parte dos casos nódulos de pequenas dimensões (73). Utiliza-se a designação «micronódulo» quando as dimensões do nódulo são inferiores a 10 mm. Salienta-se que o risco de malignidade é semelhante nos nódulos detetados acidentalmente e nos que têm apresentação clínica inespecífica (73). De salientar que a frequência de malignidade é consideravelmente maior quando os nódulos são detetados incidentalmente no decurso de uma ^{18}F FDG-PET/CT (74) ou cintigrafia com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi (75). Os micronódulos apresentam também um risco de malignidade idêntico ao dos nódulos com dimensões iguais ou superiores a 10 mm (76).

1.4.1 – Dados clínicos

No que diz respeito aos dados da anamnese, são fatores associados a maior risco de malignidade o género masculino, a idade muito jovem (risco três a quatro vezes superior de malignidade quando surge na infância) ou muito avançada, antecedentes de exposição da cabeça e pescoço a radiações ionizantes e história familiar de carcinoma da tiroide, incluindo-se os quadros de carcinomas diferenciados da tiroide familiares, carcinoma medular da tiroide e neoplasia endócrina múltipla tipo 2, assim como outras síndromes que cursem com carcinomas da tiroide (síndrome de Cowden, de Gardner e polipose adenomatosa familiar) (70).

A maioria dos nódulos da tiroide provoca poucos ou nenhuns sintomas e, quando estes existem, na maior parte dos casos não estão relacionados com a patologia nodular da tiroide. Ainda assim, existe um número de elementos da história clínica e do exame físico que podem orientar a investigação e subsequente atitude terapêutica. É importante ter uma ideia da cronologia do crescimento do nódulo; um crescimento lento e progressivo é sugestivo de malignidade. Já um crescimento súbito e acompanhado de dor sugere uma hemorragia num nódulo quístico. Sintomas como disfagia, disфонia ou dispneia na maior parte dos casos não estão associados ao nódulo, mas se o estiverem são fortemente sugestivos de malignidade. Por outro lado, em regiões com deficiência de iodo a autonomia funcional dos nódulos é comum (77), pelo que é importante pesquisar sinais e sintomas de hipertiroidismo.

Relativamente ao exame físico, a maioria dos carcinomas da tiroide não possuem características que os permitam distinguir dos nódulos benignos. No entanto, a presença de um nódulo duro e imóvel é muito sugestivo de malignidade. A presença de adenopatias cervicais palpáveis é também um indício do provável carácter maligno.

1.4.2 – Exames complementares de diagnóstico

No que diz respeito aos exames complementares de diagnóstico, recomenda-se que seja determinado o valor sérico da TSH em doentes com patologia nodular da tiroide (6, 70). A presença de um valor abaixo do limite inferior do intervalo de normalidade ou próximo dele sugere autonomia funcional, a qual poderá ser confirmada com a realização de uma cintigrafia tiroideia. Este exame é útil sobretudo quando estão presentes várias formações nodulares, uma vez que poderão coexistir nódulos autónomos (cintigraficamente «quentes») com nódulos não funcionantes (cintigraficamente «frios»). De salientar que a identificação de um nódulo

autónomo obvia a necessidade de investigação adicional, nomeadamente a realização de citologia, uma vez que a malignidade nestes casos é muito rara (68).

A ecografia da tiroide é o exame imagiológico mais sensível para detetar e caracterizar morfologicamente lesões tiroideias, sendo recomendada a sua realização em todos os doentes com suspeita de patologia nodular ou em que esta já é conhecida. Para além de descrever o número de nódulos existentes e a sua vascularização, a ecografia permite a pesquisa de características ultrassonográficas associadas a maior risco de malignidade; entre estas, contam-se a presença de hipoecogenicidade marcada, a presença de microcalcificações, bordos irregulares e multilobulados, um padrão de vascularização intranodular proeminente (por Doppler), um diâmetro antero-posterior superior ao transversal e uma consistência firme (avaliada por elastografia) (6, 70). No entanto, todas estas características têm, isoladamente, baixa sensibilidade, não permitindo prever malignidade de uma forma independente; o risco apenas aumenta de uma forma considerável quando duas ou mais destas características estão presentes (78). Pelo contrário, um padrão isoecogénico ou hiperecogénico e uma aparência espongiiforme estão associados a benignidade.

A decisão de prosseguir ou não a investigação através da realização de uma citologia vai depender do conjunto de dados clínicos e ecográficos. De uma forma geral, podemos dizer que a citologia está indicada em todos os nódulos sólidos hipoecogénicos com dimensões superiores a 10-15 mm (6, 70, 79). No caso de os nódulos apresentarem um componente quístico importante, a recomendação geral é a partir dos 15-20 mm. Quando existirem elementos clínicos ou imagiológicos de suspeição em micronódulos (antecedentes pessoais de carcinoma da tiroide confirmado em hemi-tiroidectomia prévia, história familiar de carcinoma papilar, história familiar de carcinoma medular ou síndrome MEN 2, história de exposição craniana ou cervical a radiações ionizantes na infância ou adolescência, presença de características ecográficas suspeitas, nódulo com hiperfixação em ^{18}F FDG-PET/CT), dever-se-á também ponderar a realização de citologia (6, 70, 79).

A citologia aspirativa com agulha fina é considerada como o exame padrão na avaliação dos nódulos da tiroide. Para os resultados serem fiáveis é necessário que a amostra seja adequada, o que é definido de acordo com a presença de pelo menos seis grupos de células foliculares bem preservadas, contendo cada um deles pelo menos dez células (80). A citologia fornece resultados clinicamente relevantes em cerca de 80% dos casos, podendo a sua repetição levar ao esclarecimento adicional de metade dos casos cujo resultado inicial não foi conclusivo (68). De acordo com a classificação de Bethesda (81), os resultados deverão ser reportados numa das seis categorias mostradas na Tabela 4, correspondendo cada uma delas a um risco de malignidade definido. As categorias III e IV (e para alguns autores também a V) são interpretadas como «indeterminadas», sendo recomendada a repetição da citologia. Caso a repetição volte a reportar um resultado indeterminado, recomenda-se o tratamento cirúrgico por se considerar que o risco de malignidade o justifica.

Tabela 4 - Categorias de diagnóstico de Bethesda em citologia da tiroide e risco associado de malignidade (81)

Categoria de diagnóstico	Risco de malignidade (%)
I - Não diagnóstica/Insuficiente para diagnóstico	---
II – Benigna	0-5
III - Lesão folicular de significado indeterminado*	5-15
IV - Neoplasia folicular ou suspeita de neoplasia folicular	15-30
V - Suspeita de malignidade	60-75
VI – Maligna	> 95

*No documento original também designada «Atipia de significado indeterminado», designação que é desaconselhada pela Sociedade Portuguesa de Citologia (82)

Nos casos em que o resultado da citologia é indeterminado poder-se-á proceder à realização complementar de estudos moleculares, com vista a confirmar ou excluir malignidade (6, 70). Existem atualmente duas estratégias disponíveis: a pesquisa de um painel de mutações e estudos de expressão génica através de um *array* de expressão (83). Os primeiros caracterizam-se por um elevado Valor Preditivo Positivo (VPP); no entanto, até 14% (28% se incluirmos a categoria V de Bethesda) dos nódulos com citologia indeterminada nos quais não se encontram mutações poderão ser malignos (84, 85). Os estudos de expressão génica apresentam elevado Valor Preditivo Negativo (VPN) (93-95%) (86); estes resultados aproximam o resultado negativo do teste molecular do risco existente perante uma citologia benigna (categoria II, Tabela 4), sendo proposto um seguimento clínico semelhante.

1.5 – Princípios gerais do tratamento dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular

1.5.1 – Abordagem inicial

O tratamento dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular engloba três atitudes terapêuticas fundamentais: a cirurgia, o iodo radioativo-131 e a levotiroxina.

1.5.1.1 – Cirurgia

A cirurgia constitui a base do tratamento dos carcinomas da tiroide. Perante um diagnóstico citológico prévio de malignidade, o tratamento recomendado é a tiroidectomia total ou quase total, exceto nos microcarcinomas aparentemente unifocais sem outras características de risco (nomeadamente história de exposição prévia a radiações ionizantes na cabeça e pescoço ou suspeita de envolvimento ganglionar cervical), para os quais é recomendada a lobectomia (6-8). Quando a cirurgia é realizada a partir de um resultado da citologia indeterminado, sobretudo nas categorias III e IV de Bethesda, a lobectomia é o procedimento recomendado como primeira abordagem, exceto na presença de tumores grandes (com mais de 4 cm), nos doentes com história de exposição prévia a radiações ionizantes na cabeça e pescoço ou antecedentes familiares de carcinoma da tiroide, ou quando existe doença nodular bilateral, situações em que também se recomenda a tiroidectomia total ou quase total (6-8).

A principal fundamentação para a tireoidectomia total é o facto de o carcinoma papilar ser frequentemente multifocal e bilateral (13). A tireoidectomia total permite também a realização subsequente da terapêutica ablativa com ¹³¹I e uma monitorização sensível da recorrência através do doseamento da tiroglobulina. No entanto, estas recomendações deverão ser ajustadas à realidade local, pois se a tireoidectomia total parece ter morbidade semelhante à hemitireoidectomia quando é realizada por cirurgiões diferenciados em patologia tiroideia (87), o mesmo parece não ser verdade quando os doentes são operados por equipas cirúrgicas indiferenciadas (88). Por outro lado, no caso dos carcinomas diferenciados de baixo risco, a hemitireoidectomia também está associada a uma boa sobrevivência específica pela doença e a baixas taxas de recorrência, sendo estas geralmente suscetíveis de tratamento cirúrgico eficaz (89).

Se em relação à extensão da tireoidectomia as recomendações são relativamente consensuais, preconizando-se a tireoidectomia total para a grande maioria dos doentes com diagnóstico pré-cirúrgico de malignidade, o mesmo não se passa a respeito da linfadenectomia cervical. Existe consenso relativamente à necessidade de fazer uma excisão em bloco (também designada esvaziamento) dos compartimentos com gânglios cervicais envolvidos detetados pela clínica ou imagiologia. A recomendação quanto à necessidade de fazer ou não uma linfadenectomia do compartimento central (compartimento VI) profilática, ou seja, na ausência clínica ou imagiológica de envolvimento ganglionar, permanece em discussão. A razão pela qual ela é advogada prende-se com a elevada frequência de metástases ganglionares nos doentes com carcinomas papilares (20-90%), podendo a intervenção ter o potencial para reduzir a persistência de doença. No entanto, duas meta-análises mostraram que a linfadenectomia central profilática não se associou a uma redução significativa das recidivas locais (90, 91). Outro benefício potencial da linfadenectomia central profilática em doentes com mais de 45 anos sem suspeita clínica de metástases ganglionares prende-se com o estágio UICC/AJCC (Union Internationale Contre de Cancer/American Joint Cancer Committee) mais elevado – III – atribuído a estes doentes se forem encontrados gânglios envolvidos, em vez do estágio I ou II que seria atribuído caso o esvaziamento não tivesse sido realizado (o estadiamento é discutido no capítulo «Sistemas de estadiamento clínico-patológico»). Esta passagem para um estágio superior poderá ter implicações na decisão para realizar terapêutica ablativa. Contudo, nenhum estudo demonstrou benefícios a longo prazo com a classificação dos doentes num estágio mais elevado (92), tendo inclusive uma análise apontado para a potencial administração excessiva de iodo neste contexto (93). A linfadenectomia central profilática parece também estar associada a maior morbidade após a cirurgia (94, 95). Sabe-se também que o prognóstico conferido por gânglios envolvidos com manifestações clínicas (geralmente maiores, em número considerável e por vezes com extensão extraganglionar) é significativamente pior do que o conferido por micrometástases (96). Pelas razões anteriormente mencionadas, recomenda-se uma correta avaliação imagiológica cervical pré-operatória com vista a pesquisar eventuais metástases ganglionares. Na ausência clínica e imagiológica desta suspeita, não há recomendação para a realização de linfadenectomia central profilática por rotina, podendo a mesma ser considerada em tumores maiores ou mais invasivos (por exemplo, T3/T4) (6, 7).

1.5.1.2. – Terapêutica ablativa com ¹³¹I

O tratamento com iodo radioativo (¹³¹I) consiste na administração sistémica de ¹³¹I para irradiação seletiva de tecido tiroideu normal e/ou neoplásico. Este tratamento baseia-se no facto de os tirócitos serem o principal reservatório de iodo no corpo humano e, em consonância, o principal local de expressão do simportador de sódio e iodo (NIS), permitindo uma das formas de tratamento dirigido de maior sucesso na área da oncologia. Para além de ser muito específico para as células tiroideias de origem folicular e emitir radiação β, a qual é responsável pelo efeito terapêutico, o ¹³¹I também é um emissor de radiação γ, permitindo a aquisição de imagens representativas da distribuição do fármaco.

No tratamento dos carcinomas diferenciados da tiroide, o iodo radioativo pode ser utilizado de duas formas (97):

- terapêutica ablativa após a cirurgia, a qual pode ser considerada uma forma de tratamento adjuvante;
- terapêutica de lesões tumorais não suscetíveis de resseção cirúrgica completa e que demonstrem captação de iodo.

A terapêutica ablativa é considerada como parte do tratamento primário dos carcinomas diferenciados da tiroide, tendo sido administrada nas últimas décadas à maior parte dos doentes submetidos a tiroidectomia total ou quase total. A terapêutica ablativa tem três objetivos principais:

- destruir quaisquer restos tumorais ocultos que persistam após a cirurgia, diminuindo assim o risco futuro de recidiva;
- eliminar por completo o tecido tiroideu não tumoral persistente, permitindo a utilização futura do valor da tiroglobulina sérica como um marcador tumoral altamente sensível;
- permitir uma cintigrafia corporal alguns dias após a administração de uma dose elevada de ¹³¹I, a qual é muito sensível para a deteção de doença loco-regional e/ou metástases à distância previamente desconhecidas.

De uma forma geral, a ablação demonstrou em análises não estratificadas reduzir o risco de recorrência em cerca de 55% e de metastização à distância em cerca de 50% (98, 99). No entanto, os benefícios da ablação em termos de mortalidade não foram demonstrados em todos os grupos de risco ou estádios. Os dados do *National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study (NTCTCS)* demonstraram que uma abordagem terapêutica inicial incluindo tiroidectomia total ou quase total, terapêutica ablativa com ¹³¹I e tratamento supressivo da TSH com levotiroxina se associava a menor mortalidade específica pelo carcinoma da tiroide nos estádios III, IV e na maioria dos doentes com estágio II (100). Na análise multivariada deste estudo, que teve um tempo de seguimento médio dos doentes de três anos, a terapêutica com ¹³¹I associou-se a benefícios de uma forma independente das outras modalidades terapêuticas. No estágio I não foram reportados benefícios nem ações deletérias evidentes do tratamento (101). Estes dados foram corroborados por outro estudo recente realizado em doentes com tumores considerados de baixo risco (T1-2N0M0), com um seguimento médio de 10 anos, o qual também não encontrou benefícios em termos de sobrevivência específica condicionada pela doença (102). Estes dados poderão ser justificados pelo excelente prognóstico dos doentes incluídos no estágio I, sendo necessários tempos de seguimento muito prolongados para demonstrar

benefícios em termos de mortalidade. Neste contexto, uma revisão sistemática mostrou que quanto maior for o tempo de seguimento do estudo, mais provável é que se encontre um benefício significativo da terapêutica com ^{131}I (99). Os mesmos autores mostraram que doentes com tumores com dimensão superior a 1 cm submetidos a terapêutica ablativa apresentavam um menor risco de metástases à distância. O grupo de doentes incluídos no estágio I cujos tumores apresentem características histológicas agressivas também parece ter benefícios, quer em termos de metastização, quer em termos de sobrevivência (103). Desta forma, podemos dizer que existe uma evidência sólida no que diz respeito aos benefícios em termos de recidivas, metastização à distância e mortalidade para os doentes incluídos nos estádios III e IV da UICC/AJCC, assim como para alguns incluídos no estágio II. No entanto, sabemos que a classificação UICC/AJCC tem como objetivo estratificar os doentes com base no risco de mortalidade, sendo que várias outras características histológicas dos tumores (padrão morfológico sólido, insular, de células altas, de células colunares, variante insular ou presença de invasão vascular), as quais não estão incluídas na classificação UICC/AJCC, se associam a um risco aumentado de recorrência ou metástases (este assunto é discutido com maior profundidade no capítulo «Marcadores histopatológicos de prognóstico»). Por este motivo, recomenda-se que estas características sejam consideradas, em conjunto com a idade, tamanho do tumor, características invasivas e envolvimento de gânglios linfáticos, na decisão para realizar terapêutica ablativa (6).

Na Tabela 5 resumem-se as recomendações para a terapêutica ablativa mais utilizadas propostas por algumas sociedades científicas. De uma forma geral a *American Thyroid Association* (ATA) (6), a *European Thyroid Association* (ETA) (7) e a *European Society of Medical Oncology* (ESMO) (8) recomendam a terapêutica ablativa para todos os doentes com tumores primários com mais de 4 cm, mesmo na ausência de outras características de alto risco, assim como para os portadores de tumores que evidenciem extensão extratiroideia ou que apresentem metástases à distância. Por outro lado, todas as recomendações são contra a terapêutica com ^{131}I para doentes com microcarcinomas unifocais sem outras características de alto risco. A presença de envolvimento ganglionar é considerada como uma indicação para tratamento ablativo apenas pela ETA. Todos os doentes não incluídos nos grupos anteriores são considerados como tendo indicação provável (ETA e ESMO) ou recomendação para uso seletivo (ATA). Esta utilização seletiva tem sido progressivamente alargada a doentes com risco intermédio-alto com bons resultados (104), ainda que preliminares, prevendo-se que as recomendações de algumas sociedades científicas venham a ser revistas a curto prazo.

O ^{131}I é considerado uma terapêutica segura e com poucos efeitos secundários, dos quais se salientam pela frequência a xerostomia e aumento de cáries dentárias (105), as quais são provocadas pela irradiação involuntária das glândulas salivares, onde existe expressão do NIS. Foi também descrita obstrução dos canais nasolacrimais (106). O ^{131}I provoca ligeira disfunção gonadal transitória em ambos os géneros; devido à possível irradiação dos ovários, recomenda-se que as mulheres evitem engravidar por um período de 6-12 meses após o tratamento (6). A depressão medular com leucopenia ligeira temporária é frequente; a leucopenia e/ou trombocitopenia permanentes só ocorrem com doses cumulativas elevadas. Nos últimos anos tem sido discutido o eventual risco de neoplasias secundárias ao tratamento com ^{131}I . O risco parece estar ligeiramente aumentado, sobretudo no que diz respeito a neoplasias hematológicas (leucemias), existindo uma relação direta com a dose cumulativa de ^{131}I (107,

108). Com vista a reduzir a iatrogenia associada ao ¹³¹I, para além da individualização do tratamento/uso seletivo em doentes de risco intermédio anteriormente mencionado, duas estratégias têm sido advogadas: o uso de baixas atividades terapêuticas na ablação e a estimulação com TSH humana recombinante (rhTSH) (discutida em baixo).

Tabela 5 - Indicações para terapêutica ablativa com ¹³¹I

	Sem indicação (baixo risco de recorrência ou de mortalidade específica)	Indicação provável / Uso seletivo	Indicação definitiva
ATA (6) (2009)	Microcarcinoma intratiroideu único ou multifocal (T1 <1cm), sem histologia agressiva, NO, M0	Uso seletivo em doentes com tumores 1-4 cm (T1-T2) confinados à tiroide, com envolvimento ganglionar comprovado ou quando a combinação da idade, histologia, tamanho do tumor e envolvimento ganglionar predisser um risco intermédio a elevado de recidiva ou mortalidade específica	<ul style="list-style-type: none"> ● Tamanho do tumor primário >4cm (T3-T4) na ausência de outras características de risco elevado ou ● Extensão extratiroideia relevante qualquer que seja o tamanho do tumor ou ● Metástases à distância conhecidas
ETA (7) (2006)	Microcarcinoma intratiroideu único (T1 <1cm), sem histologia agressiva, NO, M0	T1 (>1cm)-T2, NO, M0, ou ausência de esvaziamento ganglionar ou idade <18 anos ou tiroidectomia quase total ou histologia agressiva	<ul style="list-style-type: none"> ● Resseção tumoral incompleta ou ● Resseção tumoral completa mas com extensão para além da cápsula tiroideia (T3-T4) ou envolvimento ganglionar ou ● Metástases à distância
ESMO (8) (2010)	Microcarcinoma intratiroideu único (T1 <1cm), sem histologia agressiva, NO, M0	T1 (>1cm)-T2, NO, M0, ou ausência de esvaziamento ganglionar ou tiroidectomia quase total ou histologia agressiva	<ul style="list-style-type: none"> ● T3-T4 ou ● Resseção tumoral incompleta ou ● Metástases loco-regionais ou ● Metástases à distância

Para captarem iodo, as células foliculares da tiroide precisam de ser estimuladas pela TSH. Considera-se que um valor de TSH superior a 30 µUI/mL é suficiente para assegurar a eficácia da terapêutica, quer no tecido tiroideu normal, quer no tumoral (6). Estes valores podem ser atingidos utilizando duas modalidades:

- estimulação com TSH endógena, através da suspensão do tratamento com levotiroxina durante 3-5 semanas;
- estimulação com TSH exógena, através da administração de rhTSH.

A estimulação endógena é obtida pela suspensão do tratamento com levotiroxina por 3-5 semanas; nos casos em que é utilizada uma suspensão mais prolongada (5 semanas), poder-se-á substituir a levotiroxina por liotironina (T3) nas primeiras 3 semanas. Apesar de esta estratégia reduzir o período de tempo em que os doentes permanecem em hipotiroidismo, não parecem existir benefícios em termos de sintomas ou qualidade de vida (109). A introdução da estimulação exógena com rhTSH tornou possível o atingimento de valores adequados de TSH sem os sintomas e sinais inerentes ao hipotiroidismo. Esta metodologia assume assim relevância particular para o grupo de doentes que não tolera as consequências clínicas do hipotiroidismo (por exemplo, doentes com patologia cardíaca importante), assim como para o grupo que não consegue gerar níveis apropriados de TSH endógena (hipopituitarismo). De uma forma geral, a estimulação com rhTSH demonstrou eficácia semelhante na terapêutica ablativa, com vantagens significativas em termos de qualidade de vida (109-112). Para além das vantagens anteriormente referidas, a utilização de rhTSH está associada a uma menor exposição à radiação de órgãos críticos (30-35%) como as glândulas salivares, a medula óssea ou as gónadas, devido à redução do tempo de circulação sanguínea do ^{131}I e aumento da depuração, fruto do estado eutiroideu dos doentes (113, 114). Existe assim potencial para reduzir a iatrogenia associada às terapêuticas com ^{131}I quando se utiliza estimulação exógena com rhTSH.

A atividade terapêutica utilizada deverá ser a mínima que assegure o sucesso da ablação, recomendando-se 30-100 mCi (6). Existe hoje evidência científica de que, quer com doses elevadas (100 mCi), quer com doses baixas (30 mCi), a eficácia e os resultados a longo prazo são semelhantes com estimulação endógena e exógena (111, 112, 115).

A terapêutica ablativa permite também a realização de uma cintigrafia corporal com alta sensibilidade dois a dez dias (geralmente entre o quinto e o sétimo dia) após a administração do iodo. Historicamente recomendava-se também a realização de uma cintigrafia para diagnóstico antes da administração da atividade terapêutica, podendo a mesma ser acompanhada por uma determinação da captação de iodo no leito tiroideu. A cintigrafia diagnóstica tem progressivamente sido abandonada, devido à baixa sensibilidade que apresenta para a deteção de focos metastáticos e pelo facto do resultado deste exame geralmente não condicionar a realização da terapêutica ablativa, a qual permite a realização de uma cintigrafia corporal após a terapêutica com muito maior sensibilidade (116). Para além disso, existe a possibilidade de a dose baixa de ^{131}I utilizada na cintigrafia de diagnóstico diminuir a captação da atividade terapêutica de ^{131}I administrada subsequentemente, um efeito conhecido por *stunning* (117). Pelos motivos mencionados, a realização de uma cintigrafia de diagnóstico apenas é sugerida quando não é possível estimar o tamanho dos restos tiroideus com base na ecografia ou no relatório da cirurgia, ou quando o resultado possa condicionar a decisão para realizar a ablação ou a atividade terapêutica a utilizar neste procedimento (6).

(Este assunto é desenvolvido com maior profundidade na referência (97), correspondente ao Artigo I deste trabalho).

1.5.1.3. – Tratamento com levotiroxina

A terceira atitude terapêutica fundamental no tratamento dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular consiste na administração de levotiroxina (LT4), com a intenção de frear

a TSH na abordagem inicial para a maioria dos doentes. Esta atitude baseia-se no facto das células dos carcinomas diferenciados da tiroide manterem a expressão do recetor da TSH e a resposta proliferativa à estimulação por esta hormona (118). Os dados do NTCTCS (*National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study*) mostraram que doentes com estádios mais avançados da doença (III e IV) apresentaram benefícios (menos recidivas e menor mortalidade específica pela doença) com valores muito baixos de TSH (<0,1 mUI/L) (100). Por outro lado, os doentes de baixo risco não parecem beneficiar de uma frenação completa da TSH (119). Um estudo retrospectivo mostrou que a taxa de recidiva ou mortalidade são muito baixas, desde que os valores da TSH sejam mantidos abaixo de 2,0 mUI/L (120).

O objetivo a definir para o valor ideal da TSH deverá também ter em conta a possível iatrogenia associada à tireotoxicose subclínica que é necessário induzir. Os principais riscos são a indução de arritmias supraventriculares, em particular fibrilhação auricular, e a redução da densidade mineral óssea com risco aumentado de fraturas. Doentes com estas patologias, assim como indivíduos em risco aumentado de as virem a apresentar como os idosos, deverão ser sujeitos a uma cuidadosa avaliação da relação custo-benefício deste tratamento (92).

Na Tabela 6 apresentam-se as recomendações de algumas sociedades científicas relativas ao objetivo terapêutico dos valores de TSH.

Tabela 6- Recomendações para o valor da TSH no seguimento dos doentes com carcinoma de diferenciação folicular

Sociedade científica	Objetivo terapêutico
ATA (6)	<ul style="list-style-type: none"> • Supressão inicial: 0,1-0,5 mUI/L • Doentes consideradas livres de doença, sobretudo se baixo risco de recorrência: 0,3-2,0 mUI/L • Doença persistente: <0,1 mUI/L
ETA (7)	<ul style="list-style-type: none"> • Supressão inicial: ≤0,1 mUI/L • Remissão bioquímica: 0,5-1,0 mUI/L • Doença persistente: ≤0,1 mUI/L
ESMO (8)	<ul style="list-style-type: none"> • Supressão inicial nos doentes de alto risco (opcional nos de baixo risco) • Doentes de baixo risco considerados livres de doença: TSH dentro do intervalo de normalidade • Doentes de alto risco considerados livres de doença: manter supressão (TSH≈0,1 mUI/L) durante 3-5 anos

1.5.2. – Tratamento de recidivas e doença metastática

Quando no decurso do seguimento é detetada uma recidiva loco-regional ou doença metastática, várias atitudes terapêuticas poderão ser consideradas. De uma forma geral, a hierarquia recomendada para o tratamento da doença metastática consiste nas seguintes opções: resseção cirúrgica da doença loco-regional quando é possível uma intenção curativa, tratamento com ¹³¹I de lesões que captem iodo, radioterapia externa e vigilância de casos com

doença estável ou lentamente progressiva (6). Nos últimos anos surgiram também pequenas moléculas orais com ação inibidora de cinases de tirosina (não seletivas e seletivas), as quais demonstraram ser eficazes no tratamento dos casos com doença metastática progressiva refratária ao ^{131}I , sozinhos ou em combinação com outras modalidades terapêuticas (15, 121, 122). Em virtude da experiência muito mais reduzida com estes fármacos, não existe ainda um posicionamento hierárquico claro sobre a sua utilização nas recomendações terapêuticas.

A doença loco-regional (recidiva local ou metastização ganglionar) é preferencialmente submetida a tratamento cirúrgico, sobretudo na ausência de metástases à distância. Com esta atitude terapêutica, 30-50% dos doentes poderão ser considerados como livres de doença a curto prazo (123). Na presença de envolvimento ganglionar, a recomendação é para que se faça um esvaziamento ganglionar do compartimento em causa, uma vez que é difícil pela imagiologia prévia ou pela avaliação per-cirúrgica identificar a extensão da doença metastática, evitando-se uma nova exploração futura do mesmo compartimento (a qual se associa a maior morbidade) caso não fossem identificados e removidos gânglios relevantes (6). O ^{131}I é também utilizado na doença loco-regional, na maior parte dos casos de uma forma adjuvante após a ressecção cirúrgica da doença clinicamente mais relevante. Em casos particulares poderá ser utilizado como primeira opção terapêutica, sobretudo perante recidivas ou metástases ganglionares de pequenas dimensões que captam iodo. No caso de tumores muito invasivos (por exemplo, com invasão aerodigestiva) ou proliferativos poderá também ser utilizada a radioterapia externa.

Os locais para onde os carcinomas da tiroide de diferenciação folicular metastizam à distância com maior frequência são o pulmão e o osso. A presença de metástases distantes tem importantes implicações na morbidade e mortalidade dos doentes, mas o prognóstico individual é condicionado por vários fatores como a histologia do tumor primário, a distribuição, o número e a dimensão das metástases, a idade do doente e a captação de iodo ou de glicose pelo tecido metastático (124, 125).

No caso das metástases pulmonares, os principais fatores que vão condicionar a decisão terapêutica são o tamanho das lesões, a captação de iodo/resposta ao tratamento com ^{131}I quando este já foi utilizado, e a estabilidade ou progressão das lesões. As micrometástases geralmente respondem muito bem, com taxas elevadas de remissão completa da doença. Neste contexto, recomenda-se que a doença micrometastática seja tratada com ^{131}I , com possibilidade de repetir a atividade terapêutica enquanto continuar a existir captação de iodo e evidência da doença (6, 124, 126), desde que não existam complicações e a dose cumulativa seja segura. A resposta ao tratamento da doença macronodular que capta iodo é significativamente pior, sendo raras as remissões completas (124). Ainda assim, recomenda-se que a doença macronodular que capta iodo seja tratada com ^{131}I e que as atividades terapêuticas sejam repetidas enquanto se demonstrar benefício (diminuição do tamanho das lesões ou diminuição do valor da tiroglobulina) (6). O prognóstico dos doentes com metástases pulmonares que não captam iodo é reservado, sobretudo se concomitantemente houver hipercaptação de glicose na $^{18}\text{FDG-PET/CT}$ (125). A cirurgia é uma opção que raramente é considerada, fruto da natureza extensa e difusa inerente ao processo de metastização pulmonar dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular. Os agentes citotóxicos tradicionais, como a doxorrubicina e a cisplatina, conseguem respostas parciais em menos de 25% dos casos, estando-lhes associada uma toxicidade significativa (127). Outra possibilidade consiste na administração de inibidores de

cinases de tirosina, moléculas mais recentes com ação antiangiogénica e antineoplásica direta. A utilização destes fármacos tem assumido uma importância crescente no tratamento dos tumores metastáticos refratários ao ^{131}I , sendo já propostos nas recomendações terapêuticas mais recentes, sempre que possível no âmbito de ensaios clínicos (6). Em virtude da importância crescente e especificidade inerentes a esta modalidade terapêutica, será abordada num subcapítulo próprio (em baixo).

O tratamento das metástases ósseas é geralmente individualizado e tem por base vários parâmetros: a presença ou risco de ocorrência de fraturas patológicas, o risco de compromisso neurológico no caso de metástases vertebrais, as queixas álgicas do doente, a captação de iodo e a exposição potencial da medula óssea à radiação ionizante no caso das metástases pélvicas (6, 128). O tratamento cirúrgico deverá ser sempre considerado como uma opção, recomendando-se a resseção completa do tecido metastático sempre que possível, particularmente em doentes com menos de 45 anos e doença lentamente progressiva, população em que está demonstrado o aumento da sobrevivência com esta abordagem (129). Quando não é possível uma intervenção curativa, a cirurgia pode permitir uma resseção importante de tecido neoplásico, aumentando a eficácia de tratamentos subsequentes com radiações ionizantes. Existem também vários procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos, como a vertebroplastia percutânea ou a cifoplastia, que podem ser realizados em doentes com fraturas patológicas vertebrais, melhorando significativamente a dor e a deformidade (130). O ^{131}I é utilizado no tratamento de metástases que captam iodo, tendo demonstrado poder aumentar a sobrevivência dos doentes; no entanto, raramente é curativo e a eficácia é de uma forma geral inferior à que é conseguida no tratamento de metástases pulmonares (124). A radioterapia externa é uma terapêutica eficaz para o controlo da dor, estimando-se que cerca de 70% dos doentes respondam clinicamente em 48-72 horas (128). Pode ser combinada com outras modalidades terapêuticas como a cirurgia, de uma forma adjuvante. Quando as lesões são muito dolorosas ou estão localizadas em locais nos quais a expansão súbita possa provocar dor aguda, fraturas ou compromisso neurológico, recomenda-se a radioterapia com a utilização concomitante de glucocorticoides, para minimizar a possível expansão tumoral induzida pela radiação e/ou pela estimulação pela TSH (caso se utilizasse ^{131}I). O tratamento com bifosfonatos intravenosos parece também ajudar a controlar a dor (131). Os inibidores de cinases de tirosina demonstraram também ser eficazes no tratamento de metástases ósseas, sobretudo nos casos com baixa captação de iodo e elevada captação de glicose.

O tratamento de metástases distantes noutras localizações, como o cérebro, obedece às considerações anteriormente mencionadas para as metástases pulmonares e ósseas. No entanto, devido ao número reduzido de casos, não existe uma evidência consistente relativamente aos benefícios das diversas modalidades terapêuticas, as quais geralmente têm de ser utilizadas de uma forma sequencial.

1.5.2.1. – Pequenas moléculas inibidoras de cinases de tirosina

Nos últimos anos surgiram vários fármacos pertencentes à classe das pequenas moléculas inibidoras de cinases de resíduos tirosina, as quais revelaram eficácia no tratamento dos carcinomas da tiroide metastáticos refratários ao ^{131}I . A maior parte destas moléculas tem uma

ação antiangiogénica potente, atuando ao nível das vias de sinalização mediadas pelo VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Para além disso, muitos destes fármacos atuam a um ou mais níveis das vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT, as quais estão frequentemente ativadas nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular como resultado de alterações genéticas somáticas. Apesar deste fato, não parece haver uma relação estreita entre a resposta ao tratamento e a capacidade de um fármaco específico inibir uma proteína mutada com atividade cinase de tirosina pertencente a uma destas vias (121). Existe também um fármaco em estudo, o vemurafenib (NCT01286753), que inibe especificamente a forma mutada V600E da proteína BRAF, já aprovado pela FDA para melanomas com esta mutação; esta estratégia constitui a primeira forma de terapêutica biológica realmente dirigida a uma proteína mutada aplicada aos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular.

Embora as remissões completas sejam raras, estas intervenções associam-se a benefícios clínicos (respostas parciais e estabilização da doença) em até 96% dos doentes, sendo a mediana do tempo livre de progressão da doença próxima ou superior a um ano na maior parte dos casos, o que constitui um avanço significativo relativamente às outras terapêuticas sistémicas previamente disponíveis (132). Na Tabela 7 resumem-se as características dos inibidores de cinases de tirosina com estudos nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular, assim como os resultados dos principais ensaios clínicos. A maior parte destes fármacos foram estudados em monoterapia, mas alguns ensaios já em curso estão a avaliar os benefícios potenciais de associações farmacológicas (133).

No momento atual apenas o sorafenib está aprovado pela EMA (*European Medicines Agency*) (134) e FDA (*Food and Drug Administration*) (135) para o tratamento dos carcinomas diferenciados da tiroide localmente avançados ou metastáticos, progressivos e refratários ao ¹³¹I. Quando os doentes não respondem inicialmente ou deixam de responder a este fármaco no decurso do tratamento, existe já evidência de que a utilização de outros fármacos da mesma classe pode trazer benefícios clínicos relevantes (136).

Outra possibilidade muito atrativa sob o ponto de vista clínico consiste na utilização de um fármaco que induza a captação de iodo em lesões metastáticas que já não o captam ou nunca o fizeram, sendo essa captação induzida de iodo suficiente para justificar uma terapêutica com ¹³¹I. Esta possibilidade foi já avaliada no passado com fármacos pertencentes a outras classes, como o ácido retinóico ou as tiazolidinedionas, não tendo existido sucesso consistente (137). Recentemente foi utilizado um inibidor da MEK, o selumetinib, o qual foi administrado durante quatro semanas antes da administração de ¹²⁴I com fins diagnósticos (122). Constatou-se que em 40% dos doentes houve um aumento da captação do iodo suficiente para justificar uma terapêutica com ¹³¹I, tendo todos os doentes tratados obtido benefícios clínicos (resposta parcial ou estabilização da doença).

Tabela 7 - Alvos moleculares e resultados dos principais ensaios com inibidores de cinases de tirosina em doentes com carcinoma da tiroide de diferenciação folicular

Fármaco	Alvos moleculares	Fase do estudo (ref)	n	PR (%)	SD (%)	Mediana da PFS	Mediana da OS
Axitinib	VEGFR1-3; PDGFR β ; c-KIT	II (138)	60	30	38	18,1 meses	NA
Gefitinib	EGFR	II (139)	27	0	12	3,7 meses	17,5 meses
Lenvatinib	VEGFR1-3; PDGFR β ; FGFR1-4; RET; c-KIT	II (140)	58	50	NA	12,6 meses	NA
Motesanib	VEGFR1-3; PDGFR β ; c-KIT	II (141)	93	14	67	10 meses	NA
Pazopanib	VEGFR1-3; PDGFR α/β ; c-KIT	II (142)	37	49	NA	11,7 meses	NA
Selumetinib	MEK1/2	II (143)	39	3	54	32 semanas	NA
Sorafenib	RAF; VEGFR1-3; PDGFR; RET	II (144)	30	23	53	19,7 meses	NA
		II (145)	31	31	42	18 meses	34,5 meses
		III (121)	207/210 ^a	12,2	74	10,8/5,8 ^a meses	NA
Sunitinib	VEGFR1, 2; PDGFR; RET; c-KIT; FLT3	II (146)	26	31	65	12,8 meses	NA
Vandetanib	RET; VEGFR2, 3; EGFR	II (147)	72/73 ^b	8	5	11,1/5,9 ^b meses	NA

^a sorafenib/placebo; ^b vandetanib/placebo; OS – sobrevivência global, PFS – sobrevivência livre de progressão de doença; NA – não avaliada

Existe um grupo de efeitos secundários frequentes que são comuns à maior parte destes fármacos: astenia, *rash* cutâneo, diarreia, perda de peso, anorexia, eritema palmo-plantar (sobretudo com sorafenib e sunitinib), alopecia e estomatite. Alguns efeitos parecem ser exclusivos de moléculas específicas, sendo de salientar o prolongamento do intervalo QT no caso do vandetanib e a proteinúria no caso do lenvatinib (132). Apesar destes efeitos secundários serem de uma forma geral muito menos graves do que os que estão associados às formas clássicas de tratamento antineoplásico sistémico, o carácter contínuo da sua administração pode interferir de uma forma significativa com a qualidade de vida, o que se torna sobretudo evidente pelo facto de os doentes terem poucos sintomas (apesar da presença de doença metastática progressiva) quando iniciam o tratamento.

1.6 – Seguimento dos doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular

As estratégias de seguimento dos doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular vão depender da avaliação inicial do risco de recorrência e morte pela doença. Apesar da maioria dos doentes poder ser considerada como livre de doença cerca de um ano após a abordagem terapêutica inicial, as recidivas loco-regionais e as metástases à distância podem surgir muitos anos depois (148), levando a que seja necessário estabelecer uma estratégia adequada para as diversas classes de risco. Nesta seção discutem-se os principais instrumentos de diagnóstico utilizados no seguimento dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular, assim como os protocolos mais utilizados para o seguimento dos doentes considerados de baixo risco. Para os doentes considerados de alto risco ou com doença persistente não existem recomendações específicas, devendo o seguimento ser individualizado.

O principal objetivo do seguimento a longo prazo dos doentes considerados como livres de doença é a deteção precoce de recorrências. Uma vez que a maioria dos doentes vão permanecer livres de doença, testes com elevado valor preditivo negativo (VPN) são particularmente úteis na identificação deste grupo, possibilitando uma estratégia de seguimento menos agressiva mas segura, aumentando a custo-efetividade e reduzindo a iatrogenia. Por outro lado, doentes considerados como apresentando um risco intermédio-elevado deverão ser vigiados de uma forma mais agressiva, possibilitando o diagnóstico precoce, fator essencial para o sucesso da intervenção terapêutica.

Os meios complementares de diagnóstico mais relevantes no seguimento dos carcinomas de diferenciação folicular são o doseamento da tiroglobulina (Tg) sérica e a ecografia cervical.

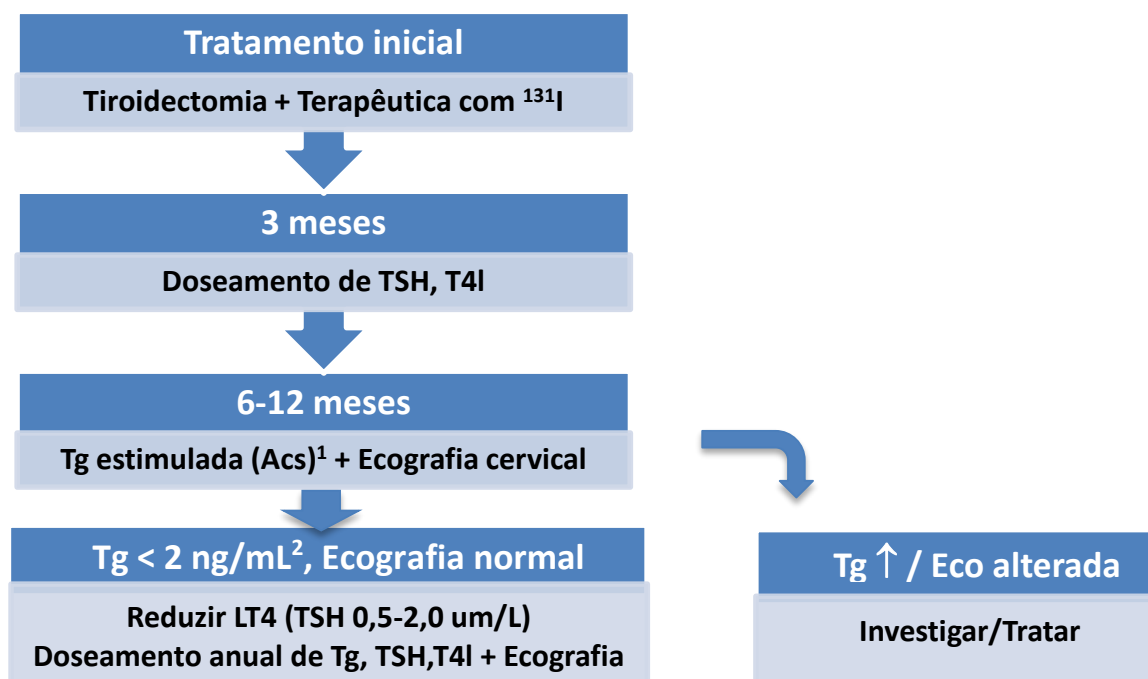
A Tg é o principal produto proteico da célula folicular da tiroide, sendo a sua síntese apenas realizada por estas células e estimulada pela TSH. O seu doseamento sérico constitui uma das bases do seguimento dos carcinomas diferenciados da tiroide, onde é utilizada como marcador tumoral, apresentando grande sensibilidade e especificidade para a deteção de tecido tiroideu, sobretudo após estimulação pela TSH endógena ou pela rhTSH. Os ensaios imunométricos, como a imunoquimioluminescência, são os mais utilizados na prática clínica, sendo geralmente calibrados de acordo com a norma CRM-457 (*Certified Reference Material*). Ainda assim, alguns estudos mostraram grande variabilidade entre ensaios diferentes, pelo que se recomenda que os doseamentos sejam repetidos pelo mesmo método no seguimento do doente individual (149). Recentemente surgiram os ensaios ultrasensíveis para a deteção da Tg (sensibilidade funcional <0,1 ng/mL), os quais poderão dispensar a estimulação em cerca de 80% dos casos (150). No entanto, os pontos de corte ainda não estão bem definidos, sabendo-se que a utilização deste método aumenta o número de doentes que não podem ser classificados como «livres de doença» por apresentarem valores doseáveis de Tg, permanecendo o significado clínico destes valores desconhecido (151). Quer os ensaios imunométricos, quer os radioimunoensaios (menos disponíveis) são suscetíveis de interferência pela presença de anticorpos anti-tiroglobulina. Por esse motivo, recomenda-se que todos os doseamentos da Tg sejam acompanhados pelo doseamento dos respetivos anticorpos (152). Quando estes anticorpos estão presentes, o doseamento da Tg não é fiável e o seguimento dos doentes deverá basear-se no resultado de outros exames complementares de diagnóstico, como a ecografia cervical e a cintigrafia. Os valores de Tg podem também ser relativamente baixos para a carga

de doença presente nos carcinomas pouco diferenciados. Ainda assim, um valor estimulado de Tg indetetável na ausência de anticorpos anti-tiroglobulina está associado a uma probabilidade de 95-99,5% de remissão completa a longo prazo (153, 154).

A ecografia cervical constitui o outro exame de eleição no seguimento destes doentes. A sua utilidade prende-se com o facto de as recidivas ou metástases ocorrerem geralmente nos gânglios cervicais (60-75%) ou no leito tiroideu (20%), sendo a ecografia um meio muito sensível de detetar estas lesões muitas vezes impalpáveis (155, 156). A ecografia cervical permite a deteção de metástases cervicais mesmo quando os valores estimulados de Tg séricos são indoseáveis (157), possibilitando a realização de citologias guiadas destas lesões que geralmente têm dimensões reduzidas. A citologia pode ser complementada com o doseamento da Tg no lavado da agulha, aumentando significativamente a sensibilidade do exame para a deteção de metástases (158).

Os protocolos de seguimento no primeiro ano após a abordagem inicial propostos pela ATA e ETA para os doentes que fizeram ablação e sem evidência de metástases na cintigrafia corporal, (representados na Figura 2), baseiam-se fundamentalmente nestes dois exames (ecografia e Tg). O doseamento de Tg estimulada apenas é proposto se a Tg basal não for detetável; caso contrário, dever-se-á de imediato proceder a estudos imagiológicos ou a terapêutica.

Figura 2 – Seguimento após a abordagem inicial



¹Na presença de anticorpos anti-tiroglobulina, o doseamento desta não poderá ser valorizado

²Ou Tg abaixo do ponto de corte para cada instituição

Adaptado de (6) e (7)

Consideram-se livres de doença os doentes que, seis a doze meses após a abordagem terapêutica inicial, apresentarem níveis de Tg estimulados abaixo do ponto de corte definido

para cada instituição (ou Tg <2 ng/mL), ecografia cervical normal e ausência de captação fora do leito cervical na cintigrafia corporal pós-terapêutica. Estes doentes poderão ser seguidos com avaliação clínica anual e doseamento da Tg e respetivos anticorpos, podendo também ser realizada ecografia cervical (6, 7, 157).

A ecografia cervical geralmente deteta a doença loco-regional cervical. Quando a Tg é superior ao ponto de corte definido para a instituição em causa ou, de uma forma mais abrangente, é superior a 2 ng/mL, várias hipóteses se colocam para esclarecer o significado clínico. Neste grupo de doentes, cerca de um terço vão ter doença clinicamente significativa e os outros dois terços vão permanecer livres de doença clinicamente significativa, geralmente com decréscimo progressivo dos valores de Tg ao longo do tempo (159). Uma das hipóteses consiste na realização de uma cintigrafia corporal diagnóstica, a qual deverá ser realizada com ¹²³I (quando disponível) ou baixa atividade de ¹³¹I. Alternativamente, poderá ser feita logo uma terapêutica com dose elevada de ¹³¹I (recomendada sobretudo se os valores da Tg estimulada forem superiores a 5-10 ng/mL) e cintigrafia corporal após a mesma, apresentando esta última maior sensibilidade para a deteção de doença (116). Quando a cintigrafia corporal não consegue localizar a doença residual ou metastática, está recomendada a realização de TC cervico-torácica, RMN cervical ou ¹⁸FDG-PET/CT (6). Nos últimos anos a ¹⁸FDG-PET/CT tem assumido uma importância crescente na avaliação dos doentes com evidência bioquímica de doença (particularmente com valores de Tg >10 ng/mL) mas sem captação de iodo nas cintigrafias corporais (160). Para além disso, a ¹⁸FDG-PET/CT é um importante instrumento de prognóstico, uma vez que permite identificar o grupo de doentes com doença metastática que apresenta um risco de mortalidade específica pela doença mais elevado (125).

1.7 – Indicadores de prognóstico em carcinomas da tiroide de diferenciação folicular

Como foi já referido os carcinomas da tiroide de diferenciação folicular representam um desafio sob o ponto de vista do prognóstico dos doentes. Sendo o carcinoma papilar o mais frequente e apresentando de uma forma geral um bom prognóstico, verifica-se que cerca de 10-15% dos casos tornam-se refratários ao tratamento e uma parte destes pode ser letal. Por outro lado, o aumento da incidência dos carcinomas da tiroide, fruto sobretudo da deteção de pequenos carcinomas com bom prognóstico, torna mais premente a necessidade de bons indicadores de prognóstico, os quais possibilitem o adequado e atempado tratamento dos poucos doentes com formas mais agressivas e permitam um seguimento com pouca iatrogenia dos restantes.

Nesta seção revêm-se os principais elementos clínicos, histopatológicos e moleculares que foram propostos como marcadores de prognóstico. Muitos destes elementos estão fortemente interrelacionados e não são independentes na predição do prognóstico, o que levou ao desenvolvimento de vários sistemas de estadiamento ou cálculo do risco de recorrência ou mortalidade, os quais vão alocar os doentes em grupos com prognóstico idêntico. Face à baixa mortalidade deste tipo de tumores, discutir-se-á sempre que oportuno o risco de recorrência e de mortalidade para cada fator considerado.

1.7.1. – Marcadores clínicos e analíticos de prognóstico

Vários elementos clínicos demonstraram ter importância na definição do prognóstico dos doentes. Alguns destes elementos podem ser avaliados na altura do diagnóstico e utilizados na definição imediata da melhor estratégia terapêutica. Outros dados apenas vão estar disponíveis na altura ou pouco tempo após a abordagem terapêutica inicial, servindo fundamentalmente para definir o seguimento dos doentes.

1.7.1.1. – Idade

A idade dos doentes na altura do diagnóstico é um importante fator de prognóstico de recorrência e mortalidade nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular. O efeito da idade no prognóstico aumenta de forma progressiva com cada década, sobretudo depois dos 40-45 anos. Numa grande série com um tempo de seguimento de 40 anos, Mazafferri *et al* reportaram uma taxa de mortalidade específica pela doença de 1,8% para os doentes com diagnóstico antes dos 40 anos, 12% para os que tinham mais de 40 anos e 21% para os que tinham mais de 50 anos no momento do diagnóstico (161). Outra série com 810 doentes apresentou uma mortalidade específica de 4% para os doentes com diagnóstico antes dos 45 anos, enquanto que os casos diagnosticados aos 45 anos ou após apresentaram uma mortalidade de 27% (162). Um doente diagnosticado após os 45 anos parece apresentar uma probabilidade 32 vezes maior de vir a falecer pela doença (163). Este ponto de corte – 45 anos – é reconhecido pela UICC/AJCC como um determinante *major* do prognóstico dos doentes (ver capítulo «Sistemas de estadiamento»). Estes dados são consistentes com a observação de que a população infantil apresenta uma baixa taxa de mortalidade, mesmo quando está presente doença extensa com metástases na apresentação (164).

Os doentes mais velhos apresentam com maior frequência variantes histológicas agressivas, doença cervical extensa e metástases distantes no momento do diagnóstico. Os tumores tendem a ser menos diferenciados nesta população, exibindo menor captação de ¹³¹I nas metástases (165). Os doentes mais velhos desenvolvem recidivas com maior frequência e mais rapidamente do que os doentes mais jovens (166).

1.7.1.2. – Género

Apesar da incidência de cancro da tiroide ser duas a quatro vezes maior no género feminino, a taxa de mortalidade em mulheres é apenas 1,3 vezes maior quando comparado com a dos homens (167). Em algumas séries, os doentes do género masculino apresentaram mais frequentemente doença mais avançada no diagnóstico, o qual é realizado em idade mais avançada, assim como menor sobrevivência livre de doença e maior mortalidade (168). Estes dados foram confirmados numa análise recente de um registo oncológico de base populacional entre 1988 e 2007, o SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), na qual o género masculino apresentou maior mortalidade específica pela doença, embora não fosse um determinante independente da mesma (169).

1.7.1.3. – História familiar

Os estudos que avaliaram a agressividade dos carcinomas diferenciados da tiroide familiares em comparação com os casos esporádicos não são concordantes (170). Algumas séries demonstraram uma associação entre os casos familiares e maior frequência de multifocalidade nos carcinomas papilares (171, 172), extensão extratiroideia (171), envolvimento ganglionar

linfático (171), recidivas (172) e maior mortalidade específica (172). Estes resultados não foram confirmados noutras séries (173, 174).

1.7.1.4 – Doença autoimune da tiroide

A influência da doença autoimune da tiroide clinicamente evidente no prognóstico dos carcinomas diferenciados da tiroide é controversa. Nalgumas séries, os doentes que tinham antecedentes de tiroidite de Hashimoto apresentaram melhor prognóstico (175). Estes dados foram recentemente corroborados por um estudo clínico que incluiu mais de 700 doentes (176). A tiroidite de Hashimoto foi um fator preditivo independente de envolvimento ganglionar menos frequente e menor ocorrência de doença persistente no final do seguimento. Pelo contrário, a coexistência de doença de Graves está associada a pior prognóstico nos carcinomas clinicamente evidentes (mas não nos microcarcinomas papilares ocultos). Os doentes com doença de Graves previamente conhecida tendem a apresentar doença cervical mais extensa, maior risco de metastização e maior mortalidade (177, 178).

1.7.1.5. – Níveis pré-operatórios de TSH

O valor sérico da TSH está diretamente associado com o risco de malignidade nos nódulos da tiroide (179). O valor pré-operatório da TSH também parece estar associado a estágio mais avançado no diagnóstico, extensão extratiroideia ampla e metastização ganglionar (180).

1.7.1.6. – Extensão da cirurgia primária

A extensão da primeira intervenção cirúrgica tem importantes implicações no prognóstico. A tireoidectomia total ou quase total diminui significativamente as taxas de recorrência e de mortalidade para tumores com mais de 1,0 cm de dimensão (181). A resseção incompleta de focos neoplásicos está associada a pior prognóstico.

A utilidade da linfadenectomia profilática do compartimento central (VI) é controversa (discutido no capítulo «Abordagem inicial»), não sendo claro que se associe a menor taxa de recidivas ou mortalidade (94).

1.7.1.7. – Tiroglobulina pós-operatória ou no momento da ablação

A determinação sérica da tiroglobulina após a ablação constitui uma das bases do seguimento dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular (discutido na referência (182), correspondente ao Artigo II do presente trabalho, assim como no capítulo «Seguimento dos doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular» e no texto em baixo).

O interesse da determinação da Tg após a cirurgia ou no momento da ablação foi inicialmente questionado, uma vez que o remanescente tiroideu normal contribui para a produção de Tg. Apesar disto, vários estudos demonstraram a utilidade da determinação da Tg no momento da ablação sob estimulação endógena da TSH (153, 183-185). Uma meta-análise avaliou o valor preditivo da Tg estimulada pela TSH endógena na ablação para prever um estado livre de doença no final do seguimento (186); os autores concluíram que esta determinação simples apresenta um elevado VPN, devendo um valor baixo de Tg na ablação (< 10 ng/ml) ser considerado um fator de risco favorável.

A preparação para a ablação com ¹³¹I após rhTSH impede a determinação da Tg estimulada antes da administração de ¹³¹I. A estimulação com rhTSH faz-se através da administração de duas injeções de 0,9 mg em dias consecutivos (dias 1 e 2), sendo o pico de TSH atingido no terceiro

dia, altura em que deverá ser administrado o ¹³¹I. Por outro lado, o valor da Tg só deverá ser determinado no quinto dia, momento em que atinge o pico. Uma alternativa consiste na valorização da Tg basal (não estimulada), mas o valor desta determinação não está ainda estabelecido, parecendo ser válido apenas para os doentes de baixo risco (187).

1.7.2. – Marcadores histopatológicos de prognóstico

A histopatologia permite a classificação morfológica dos carcinomas de diferenciação folicular em carcinomas papilares, carcinomas foliculares, carcinomas pouco diferenciados e carcinomas indiferenciados ou anaplásicos. As implicações de cada um destes histotipos em termos de prognóstico já foram sumariamente discutidas no capítulo «Classificação dos tumores da tiroide». Tal como aí é referido, os carcinomas diferenciados (papilar e folicular) apresentam prognóstico semelhante quando ajustado ao estágio, sendo por isso abordados em conjunto.

Para além do histotipo, o estudo histológico permite avaliar vários elementos com importância na determinação do prognóstico.

1.7.2.1. – *Tamanho do tumor*

De uma forma geral, existe um aumento gradual do risco de recorrência e de mortalidade com o aumento das dimensões do tumor primário (161, 162). Os microcarcinomas papilares (< 1cm) apresentam um excelente prognóstico, sobretudo quando são detetados acidentalmente (38, 188). No que diz respeito ao risco de mortalidade em tumores com mais de 1 cm, o risco parece aumentar sobretudo a partir dos 4 cm (162).

1.7.2.2. – *Extensão extratiroideia*

A extensão do tumor para além da cápsula da tiroide, invadindo os tecidos adjacentes, é considerada de forma unânime um fator de mau prognóstico, correlacionando-se com um aumento global da mortalidade em todos os histotipos (162, 163). No entanto, parece haver uma relação entre o grau de invasão dos tecidos peritiroideus e o prognóstico, constatando-se que os tumores com extensão extratiroideia mínima (microscópica) parecem ter baixa taxa de recorrências e mortalidade, ao contrário dos que têm extensão ampla (presença de invasão macroscópica detetada durante a cirurgia ou invasão do tecido subcutâneo, laringe, traqueia, esófago, nervo laríngeo recorrente, fáscia pré-vertebral, vasos do mediastino ou artéria carótida), os quais apresentam taxas de recidiva e mortalidade aumentadas (189, 190).

1.7.2.3. – *Invasão vascular*

A importância da invasão vascular como fator de prognóstico é controversa (191). No entanto, uma análise recente em mais de 4000 casos demonstrou que a invasão vascular se associava com a presença de metástases à distância em cerca de um terço dos carcinomas diferenciados e metade dos carcinomas pouco diferenciados, colocando-a como um importante determinante do prognóstico (192). A discrepância de resultados parece dever-se à heterogeneidade de definições utilizadas para definir invasão vascular nos diferentes estudos.

1.7.2.4. – *Multifocalidade*

Os carcinomas papilares são multifocais em 20-80% dos casos (13). A importância prognóstica da multifocalidade é discutível, tendo sido associada a aumento do risco de recorrência loco-regional e metástases à distância em alguns estudos mas não em outros (162, 193, 194).

1.7.2.5. – Variantes histológicas consideradas agressivas

No que diz respeito ao carcinoma papilar, são consideradas variantes associadas a pior prognóstico a variante esclerosante difusa, a variante de células altas e de células colunares.

A variante esclerosante difusa é característica de doentes jovens (idade média de 30 anos) e foi associada a maior frequência de extensão extratiroideia, metástases ganglionares e recidivas loco-regionais (195, 196).

A variante de células altas é característica de pessoas mais velhas e está associada a uma frequência maior de metástases ganglionares, metástases à distância e maior mortalidade específica pela doença (195, 197).

A variante de células colunares é caracterizada por um aspeto pseudoestratificado do arranjo celular. A associação a um pior prognóstico é controversa (198).

A variante sólida do carcinoma papilar é definida histologicamente por um tumor com um padrão de crescimento sólido que apresenta as características histológicas (incluindo todas as características nucleares) dos carcinomas papilares (4). Trata-se de um tumor que atinge predominantemente a idade pediátrica ou os adultos jovens, podendo estar associado à exposição a radiações ionizantes (199). Algumas séries mostraram uma associação com pior prognóstico (200), mas esta relação não é consensual (197).

Para alguns autores, a variante do carcinoma papilar com áreas focais insulares também parece apresentar pior prognóstico (4). No entanto, não existe uniformidade na definição desta variante, sendo a maior parte da evidência a favor da maior agressividade destes tumores construída a partir de séries que estudaram carcinomas insulares que preenchiam critérios de carcinoma pouco diferenciado. Estes últimos são característicos de idosos, são mais frequentes no género masculino, apresentam grandes dimensões, extensão extratiroideia frequente, assim como metástases ganglionares e à distância (201). Em consonância, a mortalidade neste grupo está aumentada.

As variantes oncocíticas do carcinoma papilar e carcinoma folicular não parecem estar associadas a pior prognóstico, mas poderão apresentar pior resposta ao tratamento com ¹³¹I.

1.7.2.6. – Metástases ganglionares

O impacto da presença de metástases ganglionares no prognóstico é controverso. Um consenso recente mostrou que não é a presença por si só de envolvimento ganglionar que determina aumento do risco de recorrência, mas sim a existência de doença ganglionar de grau elevado (96). Esta última é definida pela presença de doença ganglionar clinicamente evidente, presença de gânglios metastáticos com dimensões superiores a 3 cm ou presença de mais de cinco gânglios envolvidos.

1.7.2.7. – Metástases à distância

A presença de metástases à distância no diagnóstico é um dos principais fatores de mau prognóstico, associando-se a uma mortalidade específica aos 10 anos entre 50 e 70% (124, 161, 162). O prognóstico parece ser particularmente adverso nos doentes com mais de 45 anos e cujas metástases não captam ¹³¹I (124).

1.7.3. – Sistemas de estadiamento clínico-patológico

Uma vez que muitos dos fatores anteriormente mencionados estão fortemente interrelacionados e não são fatores preditivos independentes, vários sistemas de estadiamento foram concebidos com vista a estratificar os doentes em grupos com prognóstico semelhante. Estes sistemas baseiam-se na análise de regressão múltipla de fatores de prognóstico clínicos e patológicos combinados, com o objetivo de prever a mortalidade específica associada à doença.

Na prática clínica, o mais frequentemente utilizado é o TNM (*Tumor Node Metastases*) da UICC/AJCC, apresentado na Tabela 8.

*Tabela 8 - UICC/AJCC TNM – Sistema de estadiamento (7ª Edição)**

T- Tumor primário	
T1 - Tumor ≤2 cm de maior dimensão, limitado à tiroide	
T1a - Tumor ≤1 cm, limitado à tiroide	
T1b - Tumor >1 cm but ≤2 cm de maior dimensão, limitado à tiroide	
T2 - Tumor >2 cm but ≤4 cm de maior dimensão, limitado à tiroide	
T3 - Tumor >4 cm de maior dimensão, limitado à tiroide ou qualquer tumor com extensão extratiroideia mínima (ex, invasão do músculo esterno-tiroideu ou tecidos moles peri-tiroideus)	
T4a** - Tumor de qualquer tamanho com extensão para além da cápsula da tiroide para invadir o tecido subcutâneo, laringe, traqueia, esófago, ou nervo laríngeo recorrente	
T4b** - Tumor invade a fascia pré-vertebral ou envolve a artéria carotídea ou os vasos mediastínicos	
N – Gânglios linfáticos regionais	
Nx – Sem possibilidade de avaliar os gânglios linfáticos regionais	
N0 – Sem metástases ganglionares regionais	
N1a - Metástases no nível VI (pré-traqueal, paratraqueal, e pré-laríngeos/gânglios Delphianos)	
N1b - Metástases nos gânglios cervicais unilaterais, bilaterais, ou contralaterais (níveis I, II, III, IV, ou V) ou retrofaríngeos ou gânglio do mediastino superior (nível VII).	
M – Metástases à distância	
Mx – Sem possibilidade de avaliar metástases à distância	
M0 – Sem metástases à distância	
M1 – Presença de metástases à distância	
Estadiamento	
<i>Idade <45 anos</i>	<i>Idade ≥ 45 years</i>
Estádio I Qualquer T, qualquer N, M0	Estádio I T1, N0, M0
Estádio II Qualquer T, qualquer N, M1	Estádio II T2, N0, M0
	Estádio III T3, N0, M0 T1, N1a, M0 T2, N1a, M0 T3, N1a, M0
	Estádio IVA T4a, N0, M0 T4a, N1a, M0 T1, N1b, M0 T2, N1b, M0 T3, N1b, M0 T4a, N1b, M0
	Estádio IVB T4b, qualquer N, M0
	Estádio IVC Qualquer T, qualquer N, M1

*Adaptado de AJCC: Thyroid. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, 87-96

** Todos os carcinomas anaplásicos são considerados como T4 (T4a – carcinoma anaplásico intratiroideu; T4b - carcinoma com extensão extratiroideia ampla)

Vários outros sistemas demonstraram ser úteis na prática clínica; entre os mais populares contam-se o AGES (Age, tumor Grade, Extent and Size) (202), AMES (Age, distant Metastases, Extent and Size of primary tumor) (203), MACIS (distant Metastases, Age, Completeness of surgery, Invasion of extra-thyroidal tissues and Size of the primary tumor) (204) e NTCTCS (National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Classification) (205), que são apresentados na Tabela 9. Uma comparação dos diferentes sistemas de estadiamento demonstrou que o sistema da UICC/AJCC é o que fornece melhores indicações de prognóstico (206).

Tabela 9 - Outros sistemas de estadiamento

AGES (202)
Para carcinoma papilar da tiroide
0.05 x idade em anos (se idade ≥ 40) ou +0 (se idade < 40)
+1 (se grau 2) ou +3 (se grau 3 ou 4)
+1 (se extensão extratiroideia)
+3 (se metástases à distância)
+0.2 x tamanho do tumor (diâmetro máximo em cm)
Grupo 1: AGES score $< 4,00$
Grupo 2: AGES score = 4,00-4,99
Grupo 3: AGES score = 5,00-5,99
Grupo 4: AGES score $\geq 6,00$
AMES para carcinoma diferenciado da tiroide (203)
Baixo risco
A. Idade no diagnóstico < 41 anos para homens, < 51 anos para mulheres, sem metástases
B. Todos os outros doentes com:
1. carcinoma papilar intra-tiroideu ou carcinoma folicular com envolvimento mínimo da cápsula e
2. tumor primário < 5 cm de diâmetro e
3. sem metástases à distância
Alto risco
A. Todos os doentes com metástases à distância
B. Todos os doentes mais velhos com:
1. carcinoma papilar extratiroideu ou carcinoma folicular com envolvimento amplo da cápsula e
2. tumor primário ≥ 5 cm de diâmetro qualquer que seja a extensão da doença
Classificação clínica de De Groot's para carcinomas diferenciados da tiroide (163)
Classe I: tumores confinados à glândula tiroideia
Classe II: doentes com metástases ganglionares cervicais
Classe III: doentes com tumores com extensão extratiroideia ou com resseção incompleta do nódulo
Classe IV: doentes com metástases à distância
MACIS para carcinoma papilar da tiroide (204)
3.1 (se idade ≤ 39 anos) ou 0.08 x idade (se idade ≥ 40 anos)
+0.3 x tamanho do tumor (diâmetro máximo em cm)
+1 se resseção incompleta
+1 se localmente invasivo
+3 se metástases à distância
Grupo 1: MACIS score $< 6,00$
Grupo 2: MACIS score = 6,00-6,99
Grupo 3: MACIS score = 7,00-7,99
Grupo 4: MACIS score $\geq 8,00$
NTCTCS para todos os carcinomas da tiroide (205)
(O estágio atribuído a um doente é o mais elevado determinado pelas características clínico-patológicas)
Tumor

	Carcinoma papilar		Carcinoma folicular	
	Idade <45 anos	Idade ≥45 anos	Idade <45 anos	Idade ≥45 anos
Tamanho do tumor primário (cm)				
< 1	I	I	I	II
1-4	I	II	I	III
> 4	II	III	II	III
Descrição do tumor primário				
Multifocal microscópico	I	II	I	III
Multifocal macroscópico	I	II	II	III
Invasão da cápsula macroscópica	I	II	II	III
Invasão extraglandular microscópico	I	II	I	III
Invasão extraglandular macroscópico	II	III	II	III
Pouco diferenciado	-	-	III	IV
Metástases				
Gânglios linfáticos cervicais	I	III	I	III
Gânglios linfáticos extracervicais	III	IV	III	IV

Uma vez que os sistemas anteriormente mencionados foram concebidos para prevenir mortalidade e os carcinomas diferenciados são tumores geralmente com bom prognóstico, quer a ATA quer a ETA implementaram categorias de risco para prever a recorrência (risco baixo, intermédio e elevado) (6, 7). Estas categorias estão na base da decisão para realizar terapêutica ablativa e podem ser vistas na Tabela 5.

1.7.4. – Estratificação dinâmica do risco

O conceito de estratificação dinâmica do risco foi proposto recentemente e considera que o risco real de recorrência não é apenas determinado por uma série de elementos clínico-patológicos na altura do diagnóstico, mas também pela resposta à abordagem terapêutica inicial (207). Isto permite a transição entre categorias de risco – doentes inicialmente considerados como de risco intermédio ou alto podem, em função de uma excelente resposta ao tratamento, ser reclassificados como de risco baixo, e vice-versa. O carácter dinâmico desta metodologia permite alterar a estratégia de seguimento dos doentes, intensificando-a ou, pelo contrário, aumentando o intervalo entre as reavaliações.

A utilidade clínica desta estratégia na melhoria da avaliação do risco de recorrência foi já validada por vários grupos (207, 208).

1.7.5. – Marcadores moleculares de prognóstico

A identificação de alterações moleculares nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular e as insuficiências inerentes ao estadiamento clínico-patológico levou a que o valor prognóstico dessas alterações fosse avaliado em vários estudos. Tal como nos restantes marcadores de prognóstico, avaliou-se quer a relação entre a presença de uma determinada alteração molecular e outras características associadas a pior prognóstico (avaliação indireta do valor prognóstico), quer a relação entre a presença de uma alteração molecular e o seguimento dos doentes em termos de recorrência da doença e mortalidade (avaliação direta).

1.7.5.1. – BRAF

De entre todas as alterações moleculares conhecidas, a mutação do *BRAF* é a mais extensamente estudada sob o ponto de vista do prognóstico conferido pela sua presença.

Alguns estudos encontraram uma relação entre a presença da mutação do *BRAF* e características patológicas mais agressivas, como presença de extensão extratiroideia, presença de metástases ganglionares e estádios TNM mais avançados (53, 209). Noutros estudos não foi encontrada qualquer relação entre as características anteriormente mencionadas e a presença da mutação (210-212). No que diz respeito à metastização à distância, os resultados são claramente divergentes, existindo trabalhos que mostram uma associação entre a presença da mutação e maior frequência de metástases distantes (209) e outros que mostram exatamente o inverso – menos metástases à distância nos doentes com tumores portadores da mutação (213).

No que diz respeito ao risco de recorrência, existe também controvérsia. De uma forma geral, a presença da mutação parece associar-se a maior risco de recorrência (53, 209), mas em alguns estudos esta associação ou apenas foi encontrada na análise univariada (214), ou não foi encontrada (210). Uma revisão sistemática que analisou o valor preditivo da mutação do *BRAF* para o risco de recorrência reportou um VPP muito baixo (28%) e um VPN elevado (87%) (215). Dois estudos mostraram uma relação entre a presença da mutação e maior mortalidade específica pela doença (216, 217); no entanto, esta associação não se mantinha quando na análise multivariada se fazia o ajustamento para outras características como a idade, género, local de seguimento ou presença de metástases ganglionares ou à distância.

A presença da mutação do *BRAF* também foi associada a menor expressão do NIS e menor captação celular de iodo, quer *in vitro* (218) quer *in vivo* (219). Em consonância, foi reportada maior frequência da mutação nos tumores primitivos de doentes que desenvolveram metástases refratárias ao ^{131}I (48). No entanto, um estudo recente mostra que quer a presença da mutação do *BRAF*, quer a maior captação de ^{131}I poderão não ser determinantes no prognóstico dos doentes com metástases à distância com dimensões superiores a 1 cm, uma vez que a resposta ao tratamento com ^{131}I pode não ser influenciada nem pelo genótipo do *BRAF* nem pela aparente captação de iodo na cintigrafia (126). Recentemente, foi demonstrado que a inibição da MEK poderia restaurar a captação de ^{131}I , em grau suficiente para proporcionar eficácia terapêutica, em tumores metastáticos previamente refratários ao ^{131}I (122). Porém, os doentes com tumores com mutação do *BRAF* não foram os que apresentaram uma melhor resposta à inibição da MEK.

Em virtude da eventual associação com características clínico-patológicas mais agressivas e hipotética relação com pior prognóstico encontrados em alguns estudos, e considerando que é possível realizar a pesquisa da mutação em amostras de citologia (220), foram realizadas propostas para ter em conta o estudo molecular do *BRAF* na decisão terapêutica (maior agressividade terapêutica nos doentes com tumores mutados) (221). Todavia, o baixo VPP para recorrência sugere que a valorização na prática clínica deverá ser vista com precaução (222, 223). Neste contexto, um estudo estimou que 31% de todos os doentes e 39% dos incluídos nos estádios I e II seriam submetidos a modalidades de tratamento mais agressivas (cirurgias mais extensas, maior frequência de tratamentos com ^{131}I e em doses mais elevadas), as quais na realidade seriam desnecessárias face ao comportamento biológico dos tumores (211).

1.7.5.2. – RAS

O significado clínico das mutações do *RAS* é controverso. Alguns estudos encontraram uma relação entre a presença da mutação e maior frequência de metástases à distância e maior frequência de recorrência, particularmente em carcinomas pouco diferenciados (224-226); em alguns casos a relação apenas foi encontrada para mutações do *NRAS* (227). Outros estudos não dão suporte a esta associação com maior agressividade clínica (47, 48). De uma forma geral, a presença das mutações do *RAS*, típicas dos carcinomas com arquitetura folicular, não parecem ter implicações relevantes no prognóstico.

É de salientar que, no estudo anteriormente mencionado em que foi utilizado um inibidor da MEK (selumetinib) para aumentar a captação de iodo em carcinomas metastáticos previamente refratários ao ¹³¹I, os doentes que tiveram melhor resposta foram os que apresentavam tumores com mutação do *RAS* (122). A confirmar-se este resultado, o estudo molecular do *RAS* poderá ter no futuro implicações na predição da resposta ao tratamento com inibidores da MEK.

1.7.5.3. – RET/PTC

A presença do rearranjo *RET/PTC* foi associada à presença de metástases ganglionares e extensão extratiroideia num estudo (228), mas em vários outros trabalhos foi associada, pelo contrário, a um melhor prognóstico (229-231). Outros autores não encontraram uma relação entre a presença do rearranjo e as características clínico-patológicas (232). Face aos resultados contraditórios destes estudos e à presença do rearranjo em lesões inflamatórias e tumores benignos, existe um consenso relativo no que diz respeito à fraca utilidade clínica do rearranjo como indicador de prognóstico.

1.7.5.4. – PAX8/PPARG

O rearranjo *PAX8/PPARG* foi associado com multifocalidade e invasão vascular, colocando-se a hipótese de poder associar-se a carcinomas mais agressivos (66, 233). Esta hipótese é corroborada por trabalhos que mostraram que a ausência de expressão da proteína PPARG em carcinomas foliculares estava associada com a presença de áreas pouco diferenciadas e metástases à distância (234, 235). Por outro lado, um estudo mostrou que este rearranjo é típico da variante folicular encapsulada do carcinoma papilar, um tumor com bom prognóstico (236). Este último aspeto, juntamente com o facto do rearranjo *PAX8/PPARG* ser encontrado consistentemente em lesões benignas (237) e nunca em lesões menos diferenciadas, levanta dúvidas quanto à sua utilidade como marcador de prognóstico.

2. – Objetivos

Com o presente trabalho pretendemos contribuir para melhorar a qualidade da prática clínica prestada aos doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular, através do aprofundar de conhecimentos relativos ao comportamento biológico destes tumores e da identificação de fatores que permitam progredir na identificação dos 10-20% de doentes que vêm a desenvolver doença loco-regional e metastática e podem vir a morrer por causa da doença. O conhecimento mais profundo destes fatores contribuirá para tornar possível a individualização do tratamento dos doentes, reservando a utilização de terapêuticas mais agressivas para o pequeno grupo de doentes que efetivamente beneficia delas.

Neste contexto, este trabalho teve como **objetivo geral**:

A identificação de fatores clínico-patológicos, bioquímicos e moleculares que possam ser utilizados como indicadores de prognóstico em doentes com carcinomas diferenciados da tiroide, com ênfase nos fatores associados à metastização à distância, à persistência de doença e à mortalidade específica.

Constituíram **objetivos específicos**:

1. Na identificação de fatores clínico-patológicos e bioquímicos que possam ser utilizados como indicadores de prognóstico:
 - 1.1. Estudar em particular o valor preditivo da Tg, no momento da ablação realizada sob estimulação com rhTSH, para ausência de doença um ano depois, comparando-o com o valor preditivo da Tg no momento da ablação sob estimulação com TSH endógena.
2. Na identificação de fatores clínico-patológicos e moleculares, avaliar a sua influência no comportamento biológico dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular, possibilitando a sua utilização como indicadores de prognóstico em doentes com carcinoma diferenciado, com ênfase nos fatores associados à metastização à distância, persistência de doença, resposta ao tratamento e mortalidade específica.
 - 2.1. Estudar o valor prognóstico dos fatores clínico-patológicos considerados (idade, género, tamanho do tumor, presença de extensão extra-tiroideia, presença de invasão vascular, presença de metástases ganglionares loco-regionais, presença de metástases à distância e estágio UICC/AJCC).
 - 2.2. Estudar o papel das mutações do *BRAF* e *NRAS* na determinação do prognóstico dos doentes com carcinomas diferenciados.
 - 2.3. Contribuir para o esclarecimento da oncobiologia dos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular, através do estudo da frequência de uma nova alteração molecular presente nestes tumores, as mutações no promotor do *TERT*.
 - 2.4. Avaliar a influência das mutações no promotor do *TERT* no comportamento biológico dos tumores, analisando o seu valor como indicador de prognóstico nos doentes com carcinomas diferenciados da tiroide (metastização à distância, resposta ao tratamento, persistência da doença e mortalidade específica).

3. – Material e Métodos

Os objetivos anteriormente propostos requereram um trabalho translacional, que incluiu um estudo clínico e bioquímico, um estudo anátomo-patológico (histológico) e um estudo molecular.

O estudo clínico consistiu na análise dos dados clínicos de doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular.

O estudo anátomo-patológico consistiu na revisão de todos os casos incluídos no estudo, à luz dos critérios de diagnóstico atuais (4, 238).

O estudo molecular consistiu na análise de mutações somáticas dos genes *BRAF* e *NRAS*. Numa segunda fase, procedeu-se também à análise de mutações do promotor do *TERT*.

3.1. – Instituições envolvidas

No trabalho foram envolvidas várias instituições, cuja contribuição é especificada no decurso deste capítulo. Consideraram-se duas Instituições principais, nas quais foi realizada a maior parte do estudo, assim como outras Instituições cujo contributo foi relevante para atingir os objetivos propostos.

Instituições principais

1. Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo
(Diretores: Professora Doutora Manuela Carvalheiro até 2013; Dr. Francisco Carrilho a partir de 2013)
Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC)/ Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC)
3000-075 Coimbra
Tel: +351 239 400 423
Fax: +351 239 825 879
E-mail: endocdiab@huc.min-saude.pt
2. Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP)
(Diretor: Professor Doutor Manuel Sobrinho Simões)
Grupo de Investigação Biologia do Cancro
(Coordenadora: Professora Doutora Paula Soares)
4200-465 Porto
Tel: 225570700
Fax: 225570799
E-mail: ipatimup@ipatimup.pt

Outras Instituições

Colaboraram também na realização deste trabalho o Serviço de Anatomia Patológica dos HUC/CHUC, o Serviço de Medicina Nuclear dos HUC/CHUC, o Serviço de Anatomia Patológica do CHC/CHUC e o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S. André/Centro Hospitalar de Leiria e Pombal.

Na segunda fase do trabalho e com vista a cumprir os objetivos mencionados nos pontos 2.3 e 2.4, colaboraram também o Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar S. João - Porto, o Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia do Porto, o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Clínico e Universitário de Santiago de Compostela, o Serviço de Endocrinologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa e o Grupo de Endocrinologia Molecular da Unidade de Investigação de Patobiologia Molecular do Centro de Estudos de Doenças Crónicas da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa.

3.2. – Amostra

Para a primeira parte do estudo clínico, foram considerados os doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular seguidos na Consulta de Oncologia da Tiroide do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. A partir de uma lista consecutiva de doentes seguidos na Consulta de Oncologia da Tiroide entre 1990 e 2012, foram incluídos doentes selecionados de duas formas: aleatoriamente para a primeira parte do estudo clínico e bioquímico; de oportunidade/conveniência, para a componente do estudo molecular, sendo condição essencial a disponibilidade de tecido tumoral para a realização do estudo.

Para a primeira parte (estudo clínico e bioquímico), foram selecionados 297 doentes.

Para a segunda parte (estudo clínico e molecular), foram inicialmente selecionados 102 doentes seguidos na Consulta de Oncologia da Tiroide do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e com tecido tumoral disponível no Serviço de Anatomia Patológica da mesma instituição. Posteriormente, após a identificação de mutações do gene *TERT* nos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular, houve necessidade de alargar a amostra com a inclusão da análise molecular de tecido tumoral arquivado no IPATIMUP. Este aumento do número de casos teve como objetivos descrever com maior precisão a frequência da alteração nos diferentes histotipos e obter uma amostra com dimensão suficiente para permitir a realização de uma análise do prognóstico em termos de mortalidade específica pela doença (detalhada em capítulo próprio). A amostra incluiu também uma série de tumores obtida a partir de doentes irradiados na sequência do acidente nuclear de Chernobyl.

3.3. – Métodos de investigação

3.3.1. – Estudo clínico e bioquímico

O estudo clínico consistiu na consulta dos processos clínicos dos doentes, com recolha dos dados relativos aos seguintes elementos:

1. Elementos clínicos iniciais – idade no diagnóstico, género, diagnóstico histológico inicial, presença de doença metastática no momento do diagnóstico e sua localização (quando aplicável).

2. Tratamento – Abordagem inicial, nomeadamente tipo de tiroidectomia e de terapêutica ablativa com ¹³¹I (forma de estimulação e atividade terapêutica administrada). Nos casos com doença persistente ou recorrência foram também consideradas as outras modalidades de tratamento utilizadas, nomeadamente cirurgia, terapêutica com ¹³¹I, radioterapia externa ou tratamento com inibidores de cinases de tirosina.
3. Estudo bioquímico e hormonal – doseamentos seriados de Tg basal e estimulada, anticorpos anti-Tg, TSH e T4 livre. O doseamento de Tg foi realizado através de um ensaio de imunoluminescência automatizado (IMMULITE 2000; DPC, Buhlmann), com sensibilidade analítica de 0.2 ng/mL e sensibilidade funcional de 0.9 ng/mL. A determinação do valor dos anticorpos anti-Tg de terceira geração recorreu também a um ensaio de imunoluminescência (IMMULITE 2000), com sensibilidade analítica de 10 UI/mL e valores de referência <40 UI/mL. Considerou-se como positivo um título de anticorpos anti-Tg acima deste ponto de corte, não sendo valorizado o valor de Tg nestes casos. Os doseamentos de TSH e T4I foram realizados por imunoluminescência (IMMULITE 2000), com valores de referência entre 0,4-4,0 µUI/mL para a TSH e 0,8-1,9 ng/dL para a T4I.
4. Estudo imagiológico – cintigrafia corporal com ¹³¹I e ecografia cervical em todos os doentes. Outros exames imagiológicos, nomeadamente TAC e RMN dirigidas a localizações específicas, nos casos com suspeita de doença residual ou metastática.
5. Evolução – O seguimento dos doentes foi realizado de acordo com as recomendações clínicas internacionais (6, 7, 239), incluindo os pontos anteriormente mencionados relativos ao estudo clínico. Considerou-se a reavaliação seis a doze meses após a abordagem terapêutica inicial para definir os doentes como livres de doença, caso apresentassem Tg estimulada <1 ng/mL, ecografia cervical sem evidência de doença e ausência de captação cervical fora do leito tireoideu na cintigrafia corporal após terapêutica com ¹³¹I. Nos doentes com anticorpos anti-Tg séricos positivos, não houve valorização dos valores de Tg, sendo a avaliação dos doentes realizada em função dos outros exames complementares de diagnóstico, incluindo cintigrafia de diagnóstico com ¹³¹I em casos selecionados com dúvidas relativamente à presença ou localização da doença. Foram considerados como livres de doença no final do seguimento os doentes sem evidência imagiológica de tecido tumoral em localização cervical ou à distância e com valores de Tg basal ou estimulada <1 ng/mL na última avaliação; no caso de ser um valor basal, a definição pressupôs pelo menos um doseamento prévio estimulado com o mesmo critério (Tg <1 ng/mL). Todos os doentes que não preencheram os critérios anteriormente mencionados foram classificados como apresentando doença persistente. Considerou-se também na evolução a mortalidade específica pela doença. Os doentes que faleceram no decurso do seguimento por causas não atribuíveis ao carcinoma da tireoide foram considerados como perdidos para seguimento (censurados) à data do óbito na análise de mortalidade específica. Face ao prognóstico muito diferente dos carcinomas diferenciados quando comparado com o grupo dos «menos diferenciados» (carcinoma pouco diferenciado e carcinoma anaplásico), a análise da evolução sob o ponto de vista prognóstico centrou-se nos carcinomas diferenciados.

3.3.1.1. – Valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com rhTSH

A avaliação do valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com rhTSH constituiu um objetivo específico (1.1) do estudo clínico e bioquímico, tendo obedecido a uma metodologia própria. Procedeu-se à determinação do valor preditivo da Tg no momento da ablação para

ausência de doença um ano após a abordagem terapêutica inicial. Para além disso, comparou-se o valor preditivo da Tg na ablação sob rhTSH com o valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com TSH endógena. Tal como mencionado no capítulo «Amostra», foram selecionados 293 doentes com carcinomas diferenciados da tiroide sem evidência de metástases à distância na abordagem terapêutica inicial. Todos os doentes foram submetidos a tireoidectomia total ou quase total (num ou dois tempos), sem esvaziamento ganglionar do compartimento central por rotina, seguida de terapêutica ablativa depois de estimulação com rhTSH (n=151) ou TSH endógena (n=142). No grupo estimulado com rhTSH, a ablação consistiu na administração de 100 mCi de ^{131}I no terceiro dia, precedida de duas injeções de 0,9 mg de rhTSH realizadas em dias consecutivos, de acordo com as recomendações clínicas (6, 7). No grupo estimulado com TSH endógena, procedeu-se à suspensão da levotiroxina durante quatro semanas antes da administração de 100 mCi de ^{131}I . Quando se utilizou rhTSH, o doseamento da Tg e dos anticorpos anti-Tg foi realizado no quinto dia depois da primeira injeção de rhTSH, correspondente ao terceiro dia após a administração de ^{131}I (Figura 3). No grupo submetido a estimulação endógena, a Tg e os anticorpos anti-Tg foram doseados imediatamente antes da administração de ^{131}I .

Figura 3 - Esquema com cronologia da administração de rhTSH, administração de ^{131}I e determinação de Tg



Realizou-se uma cintigrafia corporal cinco a sete dias após a atividade terapêutica em todos os doentes. Sempre que havia suspeita de captação de ^{131}I fora do leito tiroideu, a cintigrafia foi complementada com uma SPECT/CT (*single-photon emission computed tomography*) para esclarecimento. O seguimento dos doentes incluiu uma ecografia cervical e doseamentos de Tg, anticorpos anti-Tg, TSH e T4I três meses após a ablação. Aproximadamente um ano (9-12 meses) após a ablação, repetiu-se a ecografia cervical acompanhada do doseamento da Tg estimulado com rhTSH e respetivos anticorpos anti-Tg. Os doentes foram considerados como livres de doença um ano depois da ablação se apresentassem uma ecografia cervical normal, um valor de Tg estimulado <1 ng/mL e ausência de captação de ^{131}I fora do leito tiroideu na cintigrafia pós-terapêutica. Todos os doentes que apresentaram anticorpos anti-Tg positivos em qualquer determinação foram excluídos.

Para além dos fatores anteriormente mencionados, consideraram-se os seguintes elementos clínico-patológicos: idade no momento do diagnóstico, género, diagnóstico histológico principal, estadiamento TNM UICC/AJCC, presença de características histológicas agressivas (variante de células altas, variante de células colunares ou variante sólida do carcinoma papilar ou presença de invasão vascular) e presença de metástases ganglionares no momento do diagnóstico.

Os doentes com tumores pT1-T2, N0-Nx e sem características histológicas agressivas foram considerados como de baixo risco, enquanto os doentes com tumores T3-T4, N1 ou com histologia agressiva foram considerados como de risco intermédio-alto.

3.3.2. – Estudo anátomo-patológico (histológico)

No que diz respeito aos casos selecionados para o estudo molecular, procedeu-se à revisão das lâminas por um patologista especializado em tiroide; essas lâminas foram obtidas a partir de cortes histológicos de 4 µm de espessura dos fragmentos do tumor e coradas pela hematoxilina e eosina. Na revisão foi atribuído um diagnóstico de acordo com a classificação da OMS (4) e um estágio pTNM (238). Sempre que se registou discordância entre o diagnóstico histológico inicialmente atribuído e o diagnóstico considerado na revisão, procedeu-se à avaliação das lâminas por um terceiro patologista perito em doenças da tiroide.

Para além do histotipo e respetivas variantes, foram confirmados os seguintes elementos: tamanho do tumor (maior dimensão), presença de extensão extratiroideia e presença de invasão vascular.

Com vista aos passos subsequentes do estudo molecular, o patologista procedeu à marcação nas lâminas de uma área tumoral representativa, evitando áreas com necrose ou fibrose muito acentuadas. A partir dessa marcação procedeu-se à seleção do bloco tumoral incluído em parafina para realização das análises moleculares subsequentes.

Os tumores que numa segunda fase foram adicionados à série para permitir uma análise estatística mais robusta do prognóstico estavam arquivados no IPATIMUP. A confirmação do diagnóstico histológico foi também realizada por pelo menos dois patologistas.

3.3.3. – Estudo molecular

Todos os casos selecionados para o estudo molecular foram analisados para mutações do *BRAF* e *NRAS*.

O DNA genómico foi extraído a partir de cortes de 10 µm. Procedeu-se à microdissecção da área selecionada pelo patologista, através da comparação com a lâmina corada com hematoxilina e eosina. O material obtido foi depois desparafinado com xilol, lavado em etanol e digerido com proteinase K (0,5 µg/ µL) durante a noite a 55°C, sob agitação. Posteriormente procedeu-se à precipitação e remoção de proteínas. De seguida, procedeu-se à precipitação do DNA, lavagem em etanol e re-hidratação.

As sequências do *BRAF* (exão 15) e *NRAS* (exão 2) foram amplificadas utilizando os *primers* identificados na Tabela 10, utilizando um termociclador programável (MyCycler, Bio-Rad, USA). A mistura da PCR (25 µL) foi constituída por 5 µL de PCR Buffer, 0,8 mM de dNTPs (Fermentas), 0,07 µg de cada *primer*, 0,1-0,2 µg de DNA, 0,5 U Taq DNA Polimerase (Go Taq Flexi DNA Polymerase, Promega Corporation) e 2,5 mM de MgCl₂. Depois de 5 minutos de desnaturação a 95°C, as misturas de PCR foram sujeitas a 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, *annealing* durante 40 segundos a 58°C e extensão durante 45 segundos a 72°C. A reação foi terminada com um período de extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% e purificados enzimaticamente. As amostras purificadas foram posteriormente sequenciadas, tendo a reação sido preparada da seguinte

forma: 3,0-5,7 μL do produto de PCR purificado (determinado em função da largura das bandas na eletroforese) foram adicionados a uma solução contendo 3,5 μL de Sequencing Buffer (Applied Biosystems, Forester City, CA), 0,5 μL de Big Dye Terminator (Applied Biosystems), 0,3 μL de *primer* (0,003 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e H_2O até perfazer 10 μL . A reação de sequenciação foi realizada no ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As amostras nas quais se detetou a existência de mutação foram novamente amplificadas e sequenciadas para confirmação.

Tabela 10 - Primers utilizados nas reações de amplificação e sequenciação

Gene	Exão	Sequência dos primers	Temperatura de annealing (PCR)	Tempo de annealing (PCR)
BRAF	15	Fw: TGCTTGCTCTGATAGGAAAA Rv: GGATCCAGACAACCTGTTCAA	58°C	40''
NRAS	2	Fw: GATTCTTACAGAAAACAAGT Rv: GAAAATAATGCTCCTAGTAC	58°C	40''
TERT	-	Fw: CAGCGCTGCCTGAAACTC Rv: GTCCTGCCCTTCACCTT	62°C	90''

Fw – Forward; Rv – Reverse

Para o estudo das mutações do promotor do *TERT* realizou-se a amplificação de um fragmento contendo os *hotspots* previamente descritos (51) por PCR, utilizando o kit Qiagen Multiplex PCR (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de sequenciação foi preparada com o kit ABI Prism BigDye Terminator (Perkin-Elmer, Foster City, CA), tendo sido realizada no ABI Prism 3100 Genetic Analyser na direção *Forward*; nas amostras que apresentaram mutação ou foram inconclusivas, procedeu-se a uma nova amplificação e sequenciação, desta vez em ambas as direções (*Forward* e *Reverse*).

Para a análise da expressão do mRNA do *TERT*, foi realizada uma RT-PCR quantitativa de 28 amostras de tireoide, 24 tumores e três amostras de tecido normal. Incluiu-se ainda uma referência normal, consistindo em RNA obtido a partir de nove amostras de tecido tiroideu normal. Para obtenção do cDNA, 1 μg de RNA total foi submetido a transcrição inversa usando o kit RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Burlington, ON, Canada). Os produtos da transcrição inversa foram amplificados para o *TERT* por qPCR (IDT; no. HS.PT.56a.40988589) utilizando a TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com o gene *TBP* (TATA-binding protein) como controlo endógeno (Applied Biosystems; no. 4326322E-0705006). Utilizou-se o sistema ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) para detetar o nível de amplificação, tendo sido programado para um passo inicial de dois minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos de 45 ciclos a 95 °C durante 15 s e 60 °C durante um minuto. As amplificações dos genes *TBP* e *TERT* foram realizadas em triplicado utilizando 1 μL de cDNA (≈ 50 ng) para cada amostra. A quantificação relativa dos genes analisados foi determinada utilizando o método $\Delta\Delta\text{CT}$, o qual foi previamente validado pelo método de regressão linear de Livak (gradiente =0.0696) (Sequence Detector User Bulletin 2; Applied Biosystems).

3.3.4. – Relação entre os fatores clínico-patológicos e moleculares com o prognóstico
Avaliou-se a relação entre os indicadores moleculares e os indicadores clínico-patológicos, assim como entre cada um dos anteriores e a resposta ao tratamento, estado dos doentes no final do seguimento (livres de doença ou com doença persistente) e mortalidade específica pelo carcinoma da tireoide.

3.3.5. – Análise estatística

3.3.5.1. – Métodos gerais utilizados na globalidade da amostra

O estudo estatístico foi realizado usando o software do programa comercial de estatística SPSS (versão 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A significância estatística foi assumida com um risco de 5% de erro do tipo 1.

As variáveis contínuas foram analisadas para a sua distribuição e os dados foram expressos em média (\pm desvio padrão) quando paramétricos, e mediana (intervalo) quando não paramétricos. O teste t de student e de Mann-Whitney foram usados para comparar variáveis contínuas em dois grupos com distribuição normal e não normal, respectivamente. O teste do qui-quadrado e o teste do qui-quadrado com correção de Yates foram usados para comparar variáveis nominais em dois grupos, e o teste de Wilcoxon para comparação de variáveis ordinais emparelhadas. A regressão linear e a correlação de Pearson, o odds ratio e o coeficiente de Spearman foram utilizados para analisar a associação das variáveis quantitativas, nominais e ordinais, respetivamente.

Utilizou-se a regressão logística univariada e multivariada para analisar o prognóstico em termos de metastização à distância e persistência de doença no final do seguimento.

A análise de sobrevivência de Kaplan-Meier com teste do log-rank foi usada para estimar a percentagem cumulativa de mortalidade específica pela doença. Para confirmação destes resultados efetuou-se a análise de regressão de Cox (*Cox proportional hazard regression*) multivariada.

3.3.5.2. – Análise do valor preditivo da Tg no momento da ablação

Nesta parte do trabalho, utilizou-se a análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para a determinação do melhor ponto de corte para o valor da Tg na ablação. Para este ponto de corte, calculou-se a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. O valor preditivo dos valores da Tg e dos outros fatores considerados – idade no momento do diagnóstico, género, classificação T1-T4, presença de envolvimento ganglionar no diagnóstico, estágio UICC/AJCC, histologia (papilar vs folicular) e presença de características histológicas agressivas – foi avaliado através de um modelo de regressão logística univariado e multivariado (neste último, todas as variáveis foram inseridas no modelo num só passo). Todas as variáveis com associação significativa no modelo univariado foram incluídas no modelo multivariado.

4. – Resultados e discussão

4.1 – Valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com rhTSH e sua comparação com o valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com TSH endógena

Uma vez que se procedeu à análise da amostra global para os marcadores de prognóstico clínicos, bioquímicos e moleculares, opta-se por apresentar primeiro os resultados deste estudo clínico e bioquímico.

Resultados

Grupo submetido a ablação com estimulação pela rhTSH

Foram inicialmente selecionados 151 doentes; destes, 19 foram excluídos pela presença de anticorpos anti-Tg e um doente foi excluído devido à ausência de informação clínica detalhada.

As características clínico-patológicas deste grupo estão resumidas na Tabela 11. O tratamento cirúrgico inicial foi realizado num só tempo em 88 doentes (67,2%); 43 doentes (32,8%) foram tratados em dois tempos.

A idade média dos doentes na altura da cirurgia foi de 47,2±15,0 anos. O tempo médio de seguimento depois da terapêutica com ¹³¹I foi de 24,3±9,3 meses.

Tabela 11 - Características dos doentes no momento do diagnóstico e estado na avaliação um ano após a terapêutica ablativa: grupo submetido a ablação após estimulação com rhTSH

Parâmetro	n (%)	Livres de doença, n (%)	Doença persistente ou recorrente, n (%)	p
Total	131	96 (73,3)	35 (26,7)	
Género				
Feminino	107 (81,7)	80 (74,8)	27 (25,2)	0,42
Masculino	24 (18,3)	16 (66,7)	8 (33,3)	
Idade (anos)	47,2±15,0	47,1±14,8	47,3±15,8	0,95
< 45 anos	58 (44,3)	45 (77,6)	13 (22,4)	0,32
≥ 45 anos	73 (55,7)	51 (69,9)	22 (30,1)	
Classificação TNM				
T1	37 (28,2)	29 (78,4)	8 (21,6)	0,13
T2	36 (27,5)	30 (83,3)	6 (16,7)	
T3	57 (43,5)	36 (63,2)	21 (36,8)	
T4	1 (0,8)	1 (100,0)	0 (0,0)	
N0/Nx	104 (79,4)	87 (83,7)	17 (16,3)	<0,001⁽¹⁾
N1	27 (20,6)	9 (33,3)*	18 (66,7)*	
N1a	20 (15,3)	8 (40,0)	12 (60,0)	

N1b	7 (5,3)	1(14,3)	6 (85,7)	
Estádio				
I	78 (59,5)	61 (78,2)*	17 (21,8)*	0,001
II	13 (9,9)	12 (92,3)*	1 (7,7)*	
III	36 (27,5)	23 (63,9)*	13 (36,1)*	
IV	4 (3,1)	0*	4 (100,0)*	
Histologia				
Papilar	107 (81,7)	77 (72,0)	30 (28,0)	0,47
Multifocal	41 (38,3)	30 (73,2)	11 (26,8)	0,83
Folicular	24 (18,3)	19 (79,2)	5 (20,8)	0,47
Variante agressiva⁽²⁾				
Não	115 (87,8)	88 (76,5)	27 (23,5)	0,03
Sim	16 (12,2)	8 (50,0)*	8 (50,0)*	

* Estatisticamente significativo na análise univariada.

(1) A análise estatística comparou N0/Nx vs N1.

(2) A histologia agressiva foi definida pela presença de qualquer uma das seguintes características: variante de células altas, variante sólida ou variante de células colunares do carcinoma papilar ou presença de invasão vascular em carcinomas papilares ou foliculares.

Noventa e seis doentes (73,3%) foram considerados como estando livres de doença um ano após a abordagem terapêutica inicial. No grupo com doença persistente (n=35), 27 (77,1%) apresentavam valores elevados de Tg, 17 (48,6%) apresentavam alterações na ecografia cervical e 17 (48,6%) doentes apresentavam captação de iodo fora do leito tireoideu na cintigrafia corporal pós-terapêutica. Do ponto de vista clínico, estes resultados corresponderam à presença comprovada de metástases ganglionares em 16 doentes (45,7%), as quais foram submetidas a citologia aspirativa com agulha fina e doseamento da Tg no lavado da agulha, com subsequente excisão cirúrgica (dois doentes foram classificados como N1a e 14 como N1b). Metástases à distância no pulmão ou no osso estavam presentes em nove doentes (25,7%) e três doentes (8,6%) apresentaram recorrência local no leito tireoideu. Nove doentes apresentaram apenas elevação do valor estimulado da Tg na avaliação um ano após a abordagem inicial, sem outra evidência de doença.

Valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com rhTSH

Os valores de Tg no momento da ablação variaram entre 0 e 1927 ng/mL, com valores significativamente mais elevados no grupo de doentes com doença persistente ou recorrente um ano depois (136,3±341,0 ng/mL vs 17,9±49,1; p<0,001).

Valores não doseáveis de Tg foram encontrados em 13 doentes. Um ano depois, um deles apresentou doença recorrente.

Os valores de Tg não foram significativamente diferentes entre os doentes submetidos a tratamento cirúrgico num só tempo ou em dois tempos (52,5±214,9 vs 41,6±102,7 ng/mL; p=0,75).

Antes da administração da rhTSH, o intervalo de valores da TSH era de 0,01 a 3,7 μ UI/mL. Todos os doentes apresentavam valores de T4I e T3I (quando doseada) dentro do intervalo de normalidade.

A análise da curva ROC (Figura 4) demonstrou que o valor estimulado da Tg no momento da ablação utilizando rhTSH era preditivo de doença persistente um ano depois [área sob a curva (AUC) =0,79; SE =0,05; $p < 0,001$]. Estabeleceu-se um ponto de corte para o valor da Tg de 7,2 ng/mL, ao qual correspondeu uma sensibilidade de 80,0%, uma especificidade de 62,5%, um VPP de 43,8% e um VPN de 89,6%. Este ponto de corte foi válido quer para os doentes de baixo risco (VPN=89,2%), quer para os doentes de risco intermédio-alto (VPN=90,0%) (Tabela 12).

Figura 4 - Curva ROC dos valores da Tg sérica no momento da ablação para doença persistente ou recorrente um ano depois (grupo estimulado com rhTSH)

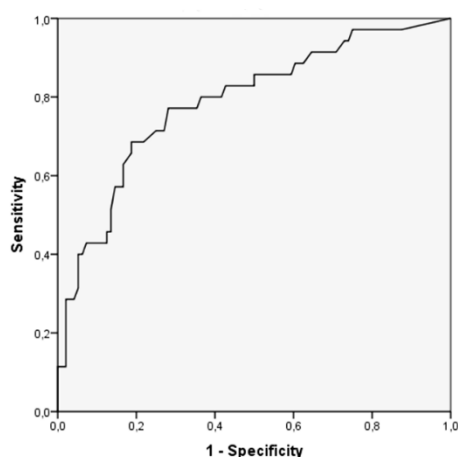


Tabela 12 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para o ponto de corte da Tg estabelecido (7,2 ng/mL) nos doentes de risco baixo e nos doentes de risco intermédio-alto (grupo estimulado com rhTSH)

Ponto de corte = 7,2 ng/mL	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
Amostra global	80,0	62,5	43,8	89,6
Risco baixo	55,6	58,9	17,9	89,2
Risco intermédio-alto	88,5	67,5	63,9	90,0

A presença de metástases ganglionares no diagnóstico ($p < 0,001$), uma variante histológica agressiva ($p = 0,03$) e um estágio mais elevado ($p = 0,001$) associaram-se significativamente a doença persistente ou recorrente um ano depois (Tabela 11).

Na análise multivariada, a Tg no momento da ablação emergiu como um marcador de prognóstico independente para o estado dos doentes um ano depois, não sendo influenciada pela presença de metástases ganglionares no diagnóstico (também um marcador de prognóstico independente), pela presença de uma histologia agressiva ou de um estágio mais elevado (Tabela 13).

Tabela 13 - Fatores preditivos para doença persistente um ano após a ablação: grupo submetido a ablação após estimulação com rhTSH

	Doença persistente	Análise Univariada		Análise multivariada	
	Sim (% do total)	OR (95%CI)	<i>p</i>	OR (95%CI)	<i>p</i>
Tiroglobulina					
<7,2 ng/mL	7 (10,4)	1 (ref)		1	
>7,2 ng/mL	28 (43,8)	8,2 (2,9-23,1)	<0,001	5,5 (2,0-15,4)	0,001
Gânglios linfáticos					
N0/Nx	17 (16,3)	1		1	
N1	18 (66,7)	10,2 (3,9-26,6)	<0,001	7,3 (2,4-22,1)	<0,001
Estádio					
I-II	18 (19,8)	1			
III-IV	17 (42,5)	3,0 (1,3-6,8)	0,007	1,5 (0,5-4,2)	0,47
Variante agressiva					
Não	27 (23,5)	1		1	
Sim	8 (50,0)	3,3 (1,1-9,5)	0,03	1,8 (0,5-6,3)	0,39

Grupo submetido a ablação com estimulação pela TSH endógena

Realizou-se uma análise semelhante num grupo de 142 doentes submetidos a terapêutica ablativa depois da suspensão da levotiroxina durante quatro semanas. Excluíram-se 17 doentes por apresentarem anticorpos anti-Tg e dois doentes por falta de dados.

As características clínico-patológicas deste grupo são resumidas na Tabela 14. O tratamento cirúrgico inicial foi realizado num tempo em 90 doentes (73,2%); 33 doentes (26,8%) foram tratados em dois tempos.

A idade média dos doentes na altura da cirurgia foi de 46,8±15,3 anos. O tempo médio de seguimento depois da terapêutica com ¹³¹I foi de 25,1±8,9 meses.

Tabela 14 - Características dos doentes no momento do diagnóstico e estado na avaliação um ano após a terapêutica ablativa: grupo submetido a ablação após estimulação com TSH endógena

Parâmetro	n (%)	Livres de doença, n (%)	Doença persistente ou recorrente, n (%)	P
Total	123	95 (77,2)	28 (22,8)	
Género				
Feminino	104 (84,6)	82 (78,8)	22 (21,2)	0,32
Masculino	19 (15,4)	13 (68,4)	6 (31,6)	
Idade (anos)	46,8±15,3	46,9±15,0	46,3±16,4	0,57
< 45 anos	57 (46,3)	44 (77,2)	13 (22,8)	0,99
≥ 45 anos	66 (53,7)	51 (77,3)	15 (22,7)	
Classificação				
TNM				
T1	40 (32,5)	29 (72,5)	11 (27,5)	0,40
T2	35 (28,4)	29 (82,9)	6 (17,1)	
T3	44 (35,8)	35 (79,5)	9 (20,5)	
T4	4 (3,3)	2 (50,0)	2 (50,0)	
N0/Nx	103 (87,7)	87 (84,5)	16 (15,5)	<0,001 ⁽¹⁾
N1	20 (16,3)	8 (40,0)*	12 (60,0)*	
N1a	11(8,9)	5 (45,4)	6 (54,5)	
N1b	9 (7,4)	3 (33,3)	6 (66,7)	
Estádio				
I	76 (61,8)	59 (77,6)	17 (22,4)	0,08
II	11 (8,9)	9 (81,8)	2 (18,2)	
III	24 (19,5)	21 (87,5)	3 (12,5)	
IV	12 (9,8)	6 (50,0)	6 (50,0)	
Histologia				
Papilar	107 (87,0)	83 (77,6)	24 (22,4)	0,82
Multifocal	49 (45,8)	38 (77,6)	11 (22,4)	0,95
Folicular	16 (13,0)	12 (75,0)	4 (25,0)	0,82
Variante agressiva⁽²⁾				
Não	96 (78,0)	79 (82,3)	17 (17,7)	0,01
Sim	27 (22,0)	16 (59,3)*	11 (40,7)*	

* Estatisticamente significativo na análise univariada.

(1) A análise estatística comparou N0/Nx vs N1.

(2) A histologia agressiva foi definida pela presença de qualquer uma das seguintes características: variante de células altas, variante sólida ou variante de células colunares do carcinoma papilar ou presença de invasão vascular no carcinoma papilar ou folicular.

Noventa e cinco doentes (77,2%) foram considerados como estando livres de doença um ano após a abordagem terapêutica inicial. No grupo com doença persistente (n=28), 25 (89,3%) apresentavam valores elevados de Tg, 16 (57,1%) apresentavam alterações na ecografia cervical e 11 (39,3%) doentes apresentavam captação de iodo fora do leito tiroideu na cintigrafia corporal pós-terapêutica. Do ponto de vista clínico, estes resultados corresponderam à presença comprovada de metástases ganglionares em 11 doentes (39,3%) (três doentes foram

classificados como N1a e oito como N1b). Metástases à distância no pulmão ou osso estavam presentes em sete doentes (25,0%) e dois doentes (7,1%) apresentaram recorrência local no leito tireoideu. Dez doentes apresentaram apenas elevação do valor estimulado da Tg na avaliação um ano após a abordagem inicial, sem outra evidência de doença.

Valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com TSH endógena

Os valores de Tg no momento da ablação variaram entre 0 e 691 ng/mL, com valores significativamente mais elevados no grupo de doentes com doença persistente ou recorrente um ano depois ($123,6 \pm 166,6$ vs $7,7 \pm 36,2$ ng/mL; $p < 0,001$).

Valores não doseáveis de Tg foram encontrados em 16 doentes. Um ano depois, nenhum deles apresentou doença recorrente.

Todos os doentes se encontravam em hipotireoidismo antes da administração de ^{131}I , com valores de TSH >30 $\mu\text{UI/mL}$ (média = $89,2 \pm 39,4$ $\mu\text{UI/mL}$; intervalo = $31-243$ $\mu\text{UI/mL}$). Não foi encontrada correlação entre os valores da TSH e da Tg ($r = 0,16$; $p = 0,09$).

Os valores de Tg não foram significativamente diferentes entre os doentes submetidos a tratamento cirúrgico num só tempo ou em dois tempos ($35,3 \pm 101,3$ vs $30,6 \pm 88,2$ ng/mL; $p = 0,81$).

O valor estimulado da Tg no momento da ablação sob estimulação da TSH endógena foi preditivo de doença persistente ou recorrente um ano depois (AUC = $0,93$; SE = $0,3$; $p < 0,001$) (Figura 5). Quando se aplicou o ponto de corte de $7,2$ ng/mL, obteve-se uma sensibilidade de $85,7\%$, uma especificidade de $83,2\%$, um VPP de $60,0\%$ e um VPN de $95,2\%$. O mesmo ponto de corte revelou-se apropriado quer para o grupo considerado de risco baixo (VPN = $95,8\%$), quer para o grupo de risco intermédio-alto (VPN = $91,7\%$) (Tabela 15).

Figura 5 - Curva ROC dos valores da Tg sérica no momento da ablação para doença persistente ou recorrente um ano depois (grupo estimulado com TSH endógena)

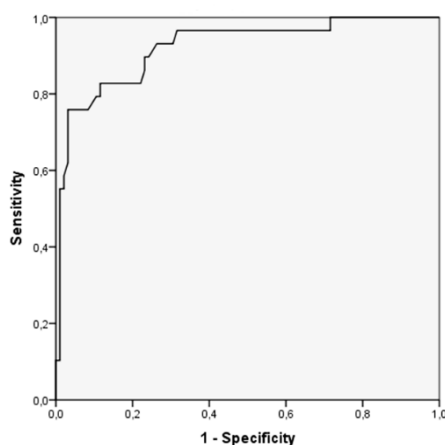


Tabela 15 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para o ponto de corte da Tg estabelecido (7,2 ng/mL) nos doentes de risco baixo e nos doentes de risco intermédio-alto (grupo estimulado com TSH endógena)

Ponto de corte = 7,2 ng/mL	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
Amostra global	85,7	83,2	60,0	95,2
Risco baixo	85,7	82,1	54,6	95,8
Risco intermédio-alto	78,6	84,6	64,7	91,7

A existência de metástases ganglionares no diagnóstico ($p < 0,001$) e as variantes histológicas agressivas ($p = 0,01$) também foram preditivas de doença persistente ou recorrente um ano depois (Tabela 14). Na análise multivariada, apenas os valores da Tg e a presença de metástases ganglionares foram fatores preditivos independentes de persistência ou recorrência tumoral um ano depois (Tabela 16).

Tabela 16 - Fatores preditivos para doença persistente um ano após a ablação: grupo submetido a ablação após estimulação com TSH endógena

	Doença persistente Sim (% do total)	Análise Univariada		Análise multivariada	
		OR (95%CI)	<i>p</i>	OR (95%CI)	<i>p</i>
Tiroglobulina					
<7,2 ng/mL	4 (4,8)	1 (ref)		1	
>7,2 ng/mL	24 (60,0)	29,6 (9,0-97,1)	<0,001	26,0 (7,3-92,5)	<0,001
Gânglios linfáticos					
N0/Nx	16 (15,5)	1		1	
N1	12 (60,0)	8,2 (2,9-23,1)	<0,001	7,2 (1,7-30,3)	0,007
Variante agressiva					
Não	17 (17,7)	1		1	
Sim	11 (40,7)	3,2 (1,3-8,1)	0,011	2,56 (0,70-9,32)	0,155

Discussão

O seguimento dos doentes com carcinomas da tiroide baseia-se no doseamento da Tg sérica como uma modalidade importante para identificar persistência ou recorrência da doença, sobretudo quando a abordagem inicial inclui tiroidectomia total e terapêutica com ^{131}I . Exames com elevado VPN são particularmente úteis no seguimento dos doentes com carcinomas diferenciados da tiroide, uma vez que eles permitem a identificação da grande maioria dos doentes que, com grande probabilidade, não vão sofrer recorrência. A definição de livre de doença 8-12 meses após a ablação implica um valor estimulado de Tg próximo do não doseável, o que se deve ao elevado VPN da Tg neste momento: doentes com Tg não doseável têm uma probabilidade de 95,0 a 99,5% de estarem livres de doença a longo prazo (153, 154).

Nos últimos anos, vários estudos avaliaram o valor preditivo da Tg no momento da ablação sob estimulação pela TSH endógena (153, 183, 184, 240-246). Apesar de se constatar uma grande amplitude nos valores encontrados para a sensibilidade (47,1-94,9%), especificidade (54,1-94,1%) e VPP (26,0-75,0%) nos diferentes estudos, o VPN apresentou um intervalo de variação muito mais estreito (81,6-99,2%). Uma meta-análise envolvendo cerca de 4000 doentes confirmou que a Tg imediatamente antes da ablação pode ser utilizada como um fator preditivo negativo para persistência ou recorrência da doença (186). Os autores definiram um valor de 10 ng/mL para uma sensibilidade e especificidade ótimas. Cerca de 70% dos doentes apresentavam valores de Tg abaixo daquele ponto de corte e o VPN global foi de 94,2%.

Nesta parte do nosso estudo, avaliámos o valor preditivo da Tg no momento da ablação estimulada com rhTSH. Os resultados mostram que a Tg no momento da ablação foi um fator preditivo independente de doença persistente ou recorrente um ano depois. A partir da análise da curva ROC, definimos um ponto de corte para a Tg de 7,2 ng/mL como sendo o mais adequado para obter uma sensibilidade e especificidade otimizadas. Um doente com Tg abaixo deste valor tinha uma probabilidade de cerca de 10% de ter doença persistente um ano depois, sendo este facto verdade quer o doente pertencesse ao grupo de risco baixo quer pertencesse ao grupo de risco intermédio-elevado. Para comparação, realizámos uma análise com a mesma metodologia num grupo com características clínicas semelhantes, no qual a ablação se fez sob estimulação pela TSH endógena. Utilizando o mesmo ponto de corte, um doente com Tg estimulada endogenamente apresentava uma probabilidade de 5% de ter doença persistente ou recorrente um ano depois.

Apesar do tempo de seguimento ser relativamente curto, a Tg estimulada no momento da ablação sob rhTSH foi capaz de prever a ausência da doença numa altura crítica durante o seguimento dos doentes com carcinomas diferenciados da tiroide – a avaliação cerca de um ano após a abordagem terapêutica inicial (153, 154). Esta determinação simples tem potencial para ser utilizada pelos clínicos como um instrumento na estratificação dinâmica do risco e, combinada com outros elementos com significado prognóstico já demonstrado, pode ser utilizada para prever uma boa evolução. Na prática clínica, o valor estimulado da Tg pode ajudar os clínicos a estabelecerem o objetivo individualizado para os níveis de TSH. A supressão inicial da TSH (<0,1 μ UI/mL) é recomendada para os doentes de risco intermédio e elevado, ao passo que nos doentes de risco baixo se recomenda um valor de TSH próximo ou ligeiramente abaixo do limite inferior do intervalo de referência (6). Os efeitos adversos da supressão da TSH incluem as consequências conhecidas da tirotoxicose subclínica, nomeadamente exacerbações de doença cardíaca isquémica e fibrilhação auricular. Os doentes com patologia cardiovascular relevante são candidatos ideais à ablação sob rhTSH, uma vez que o período de hipotiroidismo inerente à suspensão da LT4 também pode agravar a doença cardíaca. O conhecimento do VPN da Tg estimulada no momento da ablação sob rhTSH pode ajudar o clínico na decisão de não frenar a TSH, uma atitude que pode evitar iatrogenia relevante nos doentes com patologia cardiovascular. O valor preditivo da Tg no momento da ablação sob rhTSH também parece ser válido no grupo de doentes com risco intermédio-elevado. Isto pode ser importante na definição da estratégia de seguimento destes doentes, uma vez que estão disponíveis menos consensos e recomendações clínicas neste grupo. Um exame simples com elevado VPN tem o potencial para reduzir a frequência dos doseamentos estimulados de Tg e ecografias cervicais. No entanto, serão necessários estudos adicionais para confirmar os pontos anteriormente mencionados.

Quando se utiliza a rhTSH na preparação para a ablação, a Tg é medida no quinto dia depois da primeira injeção, 48 horas depois da administração de ¹³¹I (Figura 3). Um estudo prévio questionou o significado do valor da Tg quando se utilizava rhTSH neste contexto (247). Taïeb *et al* (247) analisou as alterações sequenciais da Tg sérica depois da administração de ¹³¹I em 26 doentes hipotiroideos: os valores de Tg aumentaram nas 48 horas após a administração de ¹³¹I devido à lesão celular; para além disso, os valores da Tg às 48 horas não se correlacionavam com os valores de Tg basais. Estes dados levantaram dúvidas sobre a possível aplicação da Tg no momento da ablação sob rhTSH como instrumento preditivo. O nosso estudo demonstra que os valores da Tg na ablação sob rhTSH têm valor preditivo para a presença ou recorrência de doença um ano depois, numa amostra de 131 doentes, utilizando um protocolo de seguimento concordante com as recomendações europeias e americanas (6, 7, 239). Para além disso, quando comparámos os resultados obtidos com estimulação pela rhTSH com a coorte de doentes estimulada com TSH endógena, o VPN do teste apenas era ligeiramente superior na última (89,6% vs 95,2%).

É reconhecido que os níveis de TSH são um determinante fundamental dos valores de Tg. Neste estudo, não encontramos uma correlação significativa entre os valores de TSH e de Tg no grupo que suspendeu a LT4. Neste contexto e desde que ocorra uma estimulação adequada pela TSH (TSH >30 µUI/mL), parece que a TSH não é um determinante *major* dos valores de Tg. Não apresentamos uma análise semelhante para o grupo que realizou ablação sob rhTSH, uma vez que não foi colhido sangue ao terceiro dia (correspondente ao pico da TSH) depois da primeira injeção de rhTSH, mas apenas no quinto dia, o que não possibilitou uma investigação precisa sobre a relação entre o pico da TSH e a Tg.

O ponto de corte definido neste estudo é próximo do valor estabelecido na maior parte das séries realizadas em condições de hipotiroidismo. De facto, se utilizarmos o valor definido por Webb *et al* (186) (10 ng/mL) na nossa série, o VPN seria de 89,3% para a Tg estimulada com rhTSH e 94,4% para a Tg estimulada com TSH endógena (dados não apresentados nos resultados). Quando se utiliza a Tg para deteção de tecido tumoral no seguimento dos doentes com carcinomas diferenciados da tiroide, os valores estimulados parecem ser inferiores quando se utiliza a rhTSH em comparação com a estimulação endógena (248). Ao contrário da suspensão da LT4, a ablação sob rhTSH requer o doseamento da Tg após a administração de ¹³¹I. Isto pode contribuir para elevar os valores da Tg, através da lesão celular promovida pelo ¹³¹I, no grupo de doentes estimulados com rhTSH. Embora uma comparação absoluta entre os valores da Tg estimulados por métodos diferentes deva ser vista com precaução pelas razões anteriormente mencionadas, encontramos um ponto de corte semelhante para a predição de ausência de doença na coorte que analisámos.

Um estudo realizado por Giovanella *et al* (249) avaliou o valor preditivo da Tg medida antes da ablação sob rhTSH para a deteção de metástases. Os valores de Tg foram determinados por um ensaio de elevada sensibilidade (sensibilidade funcional =0,2 ng/mL) em condições de eutiroidismo. O ponto de corte estabelecido para doença persistente/recorrente foi de 0,65 ng/mL. Este estudo sugere a possibilidade de se utilizar a Tg basal após a cirurgia determinada por um ensaio de segunda geração como um instrumento preditivo. No entanto, esta metodologia não está disponível na generalidade dos centros envolvidos no seguimento de doentes com esta patologia. O facto de os doentes terem sido submetidos a tiroidectomia total

com esvaziamento profilático dos gânglios do compartimento central também pode ter contribuído para os bons resultados obtidos no estudo de Giovanella *et al.*

Existe controvérsia sobre a relação risco-benefício do esvaziamento profilático do compartimento central (discutido no capítulo «Introdução»). A ausência de esvaziamento profilático no nosso hospital pode implicar um estadiamento menos preciso dos doentes e contribuir para o número relativamente elevado de recorrências locais. Neste contexto, o valor da Tg estimulada pela rhTSH na ablação pode desempenhar um papel relevante como marcador de prognóstico independente. No futuro, será necessário demonstrar o valor prognóstico do valor da Tg no momento da ablação estimulada com rhTSH quando se realizou esvaziamento profilático do compartimento central.

Em resumo, podemos afirmar que quando se utiliza a rhTSH na ablação, o nível assim estimulado da Tg apresenta um valor preditivo independente para a ausência de doença um ano depois. Um valor baixo de Tg nesse momento pode ser considerado um fator de prognóstico favorável.

4.2. – Valor preditivo de fatores clínico-patológicos e moleculares para metastização à distância, persistência de doença no final do seguimento e mortalidade específica

Nesta parte do estudo foi avaliado o valor preditivo dos fatores clínico-patológicos e moleculares previamente mencionados no material e métodos para a ocorrência de metastização à distância, doença persistente no final do seguimento, resposta ao tratamento e mortalidade específica pela doença.

A amostra global foi constituída por 469 doentes com carcinoma da tiroide de diferenciação folicular, incluindo 402 doentes com carcinomas diferenciados e 67 doentes com carcinomas pouco diferenciados ou anaplásicos. As características clínico-patológicas da amostra estão sumariadas na Tabela 17. Entre os doentes com carcinoma papilar, 43 (13,0%) apresentavam microcarcinomas.

Tabela 17 - Características clínico-patológicas dos doentes com carcinomas de diferenciação folicular incluídos no estudo

	Total	CPT	CFT	CPDT	CAT
Número total	469	332	70	31	36
Idade no diagnóstico (n)	469	332	70	31	36
Média (anos)	48,2±16,9	44,8±15,6	51,8±16,4	53,2±18,4	68,7±10,4
< 45 anos	211 (45,0)	178 (53,6)	23 (32,9)	8 (25,8)	2 (5,6)
≥ 45 anos	258 (55,0)	154 (46,4)	47 (67,1)	23 (74,2)	34 (94,4)
Género (n)	459	327	68	29	35
Feminino	342 (74,5)	254 (77,7)	50 (73,5)	16 (55,2)	22 (62,9)
Masculino	117 (25,5)	73 (22,3)	18 (26,5)	13 (44,8)	13 (37,1)
Tamanho do tumor (n)	418	315	61	26	16
< 2 cm*	151 (36,1)	142 (45,0)	7 (11,5)	2 (7,7)	0
2-4 cm	161 (38,5)	129 (41,0)	23 (37,7)	7 (26,9)	2 (12,5)
> 4 cm	106 (25,4)	44 (14,0)	31 (50,8)	17 (65,4)	14 (87,5)
Extensão extratiroideia (n)	373	268	49	20	36
Presente	231 (61,9)	176 (65,7)	8 (16,3)	12 (60,0)	35 (97,2)
Invasão vascular (n)	325	257	53	8	7
Presente	157 (48,3)	103 (40,1)	39 (73,6)	8 (100,0)	7 (100,0)
Metástases ganglionares (n)	391	298	47	24	22
Presentes	234 (59,8)	202 (67,8)	8 (17,0)	14 (58,3)	10 (45,5)
Metástases à distância (n)	337	263	31	20	23
Presentes	76 (22,6)	36 (13,7)	8 (25,8)	14 (70,0)	18 (78,3)
Estádio (6ª UICC/AJCC) (n)	310	225	29	20	36
I	134 (43,2)	124 (55,1)	8 (27,6)	2 (10,0)	0
II	36 (11,6)	25 (11,1)	8 (27,6)	3 (15,0)	0
III	45 (14,5)	36 (16,0)	5 (17,2)	4 (20,0)	0
IV	95 (30,7)	40 (17,8)	8 (27,6)	11 (55,0)	36 (100,0)

n – número de doentes com dados disponíveis para cada item

Os números entre parêntesis representam percentagens para cada categoria

CPT – carcinoma papilar da tiroide, CFT – carcinoma folicular da tiroide, CPDT – carcinoma pouco diferenciado da tiroide, CAT – carcinoma anaplásico da tiroide

* Número de microcarcinomas ($\leq 1,0$ cm) – Total =47 (10,0%); CPT =43 (13,0%); CFT =4 (5,7%); CPDT =0; CAT =0

A média do tempo de seguimento foi de $7,8 \pm 5,8$ anos. A totalidade do seguimento correspondeu a 2967,5 pessoa-anos para a globalidade dos doentes com carcinomas de diferenciação folicular, 2760,8 pessoa-anos para o grupo de doentes com carcinomas diferenciados, 2342,9 pessoa-anos para o grupo com carcinoma papilar e 417,9 pessoa-anos para o grupo com carcinoma folicular.

No que diz respeito ao estudo molecular, estudámos um total de 647 lesões benignas e malignas da tiroide.

Em virtude do prognóstico muito diferente dos carcinomas diferenciados da tiroide quando comparados com os pouco diferenciados e anaplásicos, optou-se por fazer a análise maioritariamente para o grupo de doentes com carcinomas diferenciados.

Uma vez que a análise de todos os factores clínico-patológicos e moleculares considerados foi realizada para os mesmos *outcomes*, a discussão global é apresentada no final de todos os resultados.

Resultados

4.2.1. – Factores clínico-patológicos

Fatores clínico-patológicos e metastização à distância

Para esta análise estavam disponíveis dados de 294 doentes. Um total de 44 doentes (15,0%) desenvolveu metástases à distância, as quais estavam localizadas no pulmão (n =28), osso (n =8), pulmão e osso (n =6), cérebro (n =1) e pulmão e rim (n =1). Os resultados estão sumariados na Tabela 18.

Tabela 18 - Factores preditivos para metastização à distância em doentes com carcinomas diferenciados

	Presença (%)	OR (95%CI)	P
Total	44 (15,0)		
Idade			
<45 anos	17 (11,5)	1 (ref)	NS
>45 anos	27 (18,5)	1,75 (0,91-3,37)	(0,09)
Género			
Feminino	28 (12,4)	1	0,02
Masculino	16 (24,6)	2,31 (1,16-4,60)	
Tamanho do tumor		1,28 (1,07-1,54)	0,009
Extensão extratiroideia			
Não	14 (15,1)	1	NS
Sim	22 (14,3)	0,94 (0,46-1,94)	(0,87)
Invasão vascular			

Não	10 (7,2)	1	<0,001
Sim	22 (23,4)	3,94 (1,77-8,78)	
Metástases ganglionares			
N0/Nx	17 (17,9)	1	NS (0,64)
N1	27 (15,7)	0,85 (0,44-1,66)	

* O tamanho do tumor foi considerado como uma variável contínua

O género masculino ($p = 0,02$), o maior tamanho do tumor ($p = 0,009$) e a presença de invasão vascular ($p < 0,001$) associaram-se significativamente com a metastização à distância.

Fatores clínico-patológicos e doença persistente no final do seguimento

Para esta análise estavam disponíveis dados de 211 doentes. Os resultados estão sumariados na Tabela 19.

Tabela 19 - Fatores preditivos para doença persistente no final do seguimento

	Presença (%)	OR (95%CI)	p
Total	58 (27,5)		
Idade			
<45 anos	25 (22,9)	1 (ref)	NS
>45 anos	33 (32,4)	1,61 (0,87-2,96)	(0,13)
Género			
Feminino	42 (24,9)	1	0,04
Masculino	16 (41,0)	2,10 (1,02-4,35)	
Tamanho do tumor		1,18 (0,97-1,43)	NS (0,10)
Extensão extratiroideia			
Não	22 (24,4)	1	NS
Sim	28 (35,9)	1,73 (0,89-3,27)	(0,11)
Invasão vascular			
Não	16 (20,0)	1	NS
Sim	22 (32,8)	1,96 (0,93-4,13)	(0,08)
Metástases ganglionares			
N0/Nx	21 (23,3)	1	0,04
N1	35 (37,2)	1,95 (1,03-3,71)	
Metástases à distância			
Não	12 (15,4%)	1	<0,001
Sim	44 (42,3%)	4,03 (1,95-8,35)	

* O tamanho do tumor foi considerado como uma variável contínua

O género masculino ($p = 0,04$), a presença de metástases ganglionares ($p = 0,04$) e a presença de metástases à distância ($p < 0,001$) associaram-se significativamente com doença persistente no final do seguimento.

Fatores clínico-patológicos e mortalidade específica pelo carcinoma da tiroide

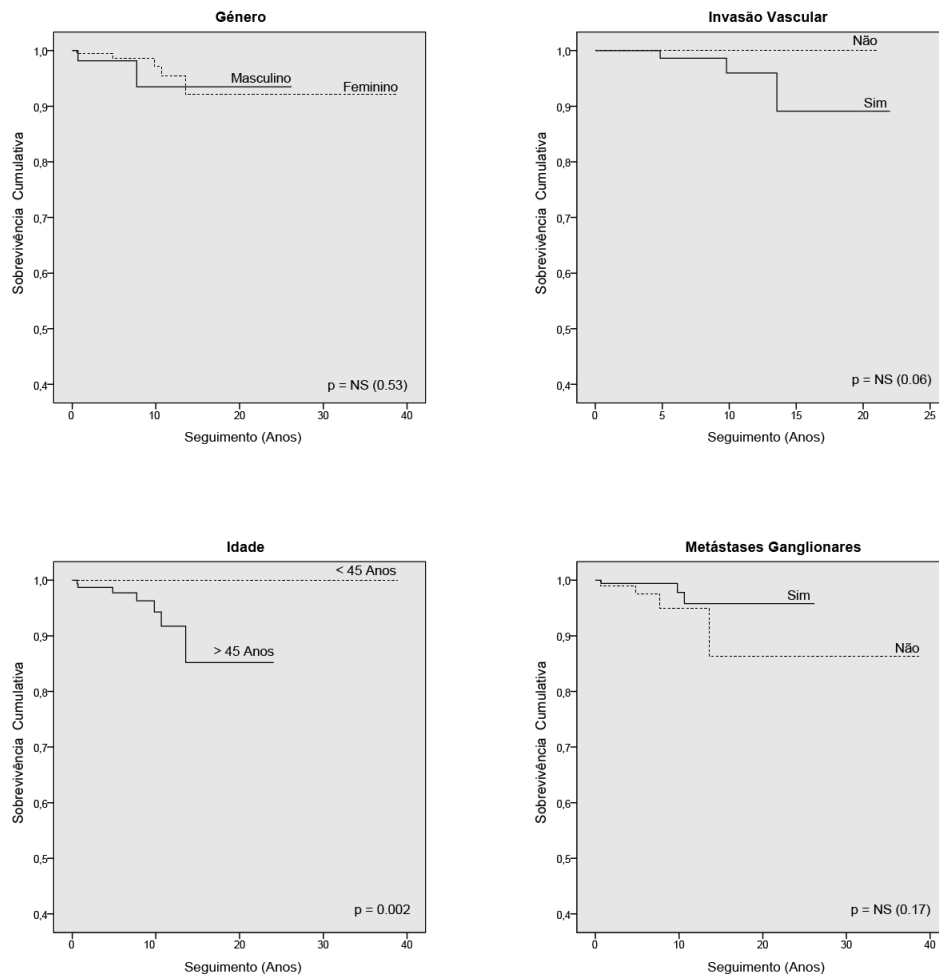
Durante o tempo de seguimento, a mortalidade específica pela doença para a globalidade da amostra de doentes com carcinomas da tiroide de diferenciação folicular foi de 11,7%. No grupo de doentes com carcinomas diferenciados, a mortalidade específica foi de 2,2%, no grupo de

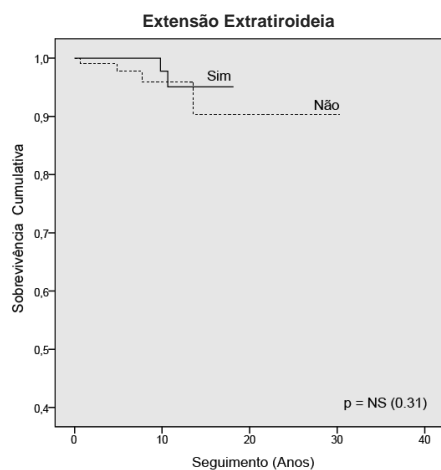
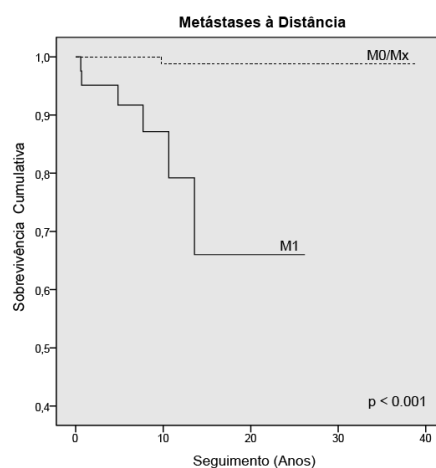
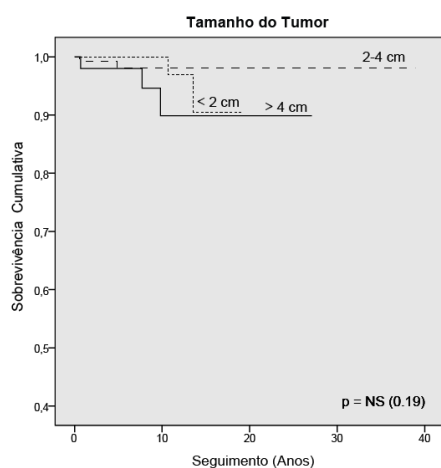
doentes com carcinoma papilar foi de 1,8% e no grupo de doentes com carcinoma folicular foi de 2,8%.

Na Figura 6 apresentam-se as curvas de Kaplan-Meier relativas à mortalidade específica pelo carcinoma diferenciado da tiroide para cada um dos fatores clínico-patológicos considerados (género, idade no momento do diagnóstico, tamanho do tumor, extensão extratiroideia, invasão vascular, metástases ganglionares e metástases à distância).

Apenas a idade no diagnóstico superior a 45 anos (log-rank $p=0,002$) e a presença de metástases à distância (log-rank $p <0,001$) se associaram significativamente a uma maior mortalidade específica pela doença.

Figura 6 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para mortalidade específica por carcinoma diferenciado da tiroide, de acordo com fatores clínico-patológicos





4.2.2. – Mutações do *BRAF* e *NRAS* na determinação do prognóstico

BRAF - Frequência das mutações

A frequência de mutações do *BRAF* nos diferentes histotipos é apresentada na Tabela 20. Todas as alterações encontradas consistiram na mutação V600E.

Tabela 20 - Frequência da mutação do *BRAF* nos diferentes histotipos

	Total	CPT	CFT	CPDT	CAT
<i>BRAF</i> (n)	422	301	56	29	36
wild-type	264 (62,6)	153 (50,8)	56 (100,0)	26 (89,7)	29 (80,6)
mutado	158 (37,4)	148 (49,2)	0	3 (10,3)	7 (19,4)

Os números entre parêntesis representam percentagens para cada categoria

CPT – carcinoma papilar da tiroide, CFT – carcinoma folicular da tiroide, CPDT – carcinoma pouco diferenciado da tiroide, CAT – carcinoma anaplásico da tiroide

Uma vez que o nosso objetivo era estudar o valor prognóstico das mutações do *BRAF* em carcinomas diferenciados e que não se encontraram mutações deste gene nos carcinomas foliculares, tal como reportado na literatura (ver capítulo «Introdução»), a análise subsequente restringiu-se ao grupo de doentes com carcinoma papilar.

No grupo de doentes com carcinoma papilar, a frequência da mutação foi de 120/211 (56,9%) na forma clássica e de 13/63 (20,6%) na variante folicular.

BRAF e fatores clínico-patológicos nos doentes com carcinoma papilar

Nos doentes com carcinoma papilar, a mutação do *BRAF* associou-se a uma idade no momento do diagnóstico mais avançada ($p = 0,005$) e a invasão vascular menos frequente ($p = 0,02$). Na Tabela 21 apresenta-se um sumário da relação entre a mutação do *BRAF* e as características clínico-patológicas.

Tabela 21 - Sumário da relação entre a mutação do BRAF e as características clínico-patológicas

	Total*	<i>BRAF</i> wt	<i>BRAF</i> mutado	p
Idade no diagnóstico (n=299)	44,8±15,6	42,0±15,5	47,1±15,5	0,005
Género (n=298)				
Feminino	231 (77,5)	116 (76,8)	115 (78,2)	NS (0,77)
Masculino	67 (22,5)	35 (23,2)	32 (21,8)	
Tamanho do tumor, cm (n=286)	2,4±1,5	2,3±1,4	2,4±1,5	NS (0,39)
Extensão extratiroideia (n=249)				
Presente	168 (67,5)	77 (65,3)	91 (69,5)	NS (0,48)
Invasão vascular (n=241)				
Presente	97 (40,2)	56 (47,9)	41 (33,1)	0,02
Metástases ganglionares (n=277)				
Presentes	193 (69,7)	97 (70,8)	96 (68,6)	NS (0,69)
Metástases à distância (n=238)				
Presentes	35 (14,7)	21 (17,2)	14 (12,1)	NS (0,26)
Estádio UICC/AJCC (n=200)				
I	112 (56,0)	56 (53,8)	56 (58,3)	NS (0,59)
II	22 (11,0)	14 (13,5)	8 (8,3)	
III	30 (15,0)	14 (13,5)	16 (16,7)	
IV	36 (18,0)	20 (19,2)	16 (16,7)	

BRAF e resposta ao tratamento

Não se encontrou relação entre a presença de mutação do *BRAF* e o número de terapêuticas com ^{131}I , a atividade cumulativa de ^{131}I ou o número de outras modalidades terapêuticas (Tabela 22).

Tabela 22 - Relação entre os procedimentos terapêuticos e a mutação do BRAF

	Total	BRAF wt	BRAF mutado	p
Número de terapêuticas com ¹³¹ I	1,77±1,20	1,79±1,34	1,88±1,15	NS (0,68)
Atividade cumulativa (mCi)	233,0±221,5	255,6±262,7	233,7±185,9	NS (0,58)
Número de outras terapêuticas*	1,07±1,59	1,16±1,84	1,18±1,46	NS (0,94)

* Consideraram-se como «outras terapêuticas» intervenções cirúrgicas adicionais, radioterapia externa ou tratamento com inibidores de cinases de tirosina

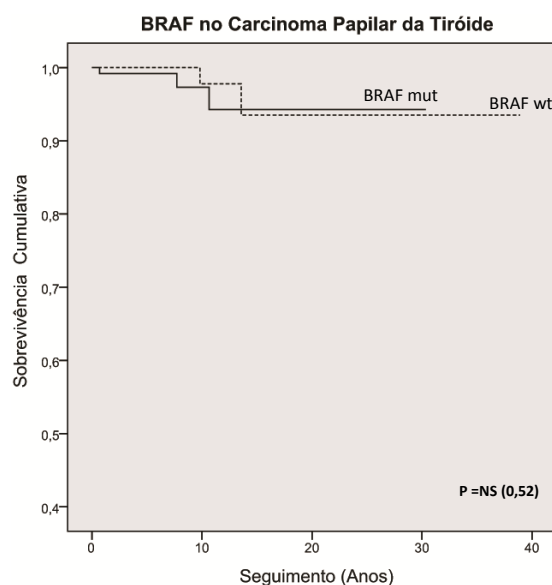
BRAF e doença persistente no final do seguimento

Os doentes com carcinoma papilar com mutação do BRAF apresentaram com maior frequência doença persistente no final do seguimento (37,1%) em comparação com os doentes com carcinoma papilar BRAF wt (22,7%), mas a diferença não atingiu o limiar da significância estatística (p =0,05).

BRAF e mortalidade específica pelo carcinoma papilar da tiroide

A mortalidade específica dos doentes com carcinoma papilar com e sem mutação do BRAF foi semelhante (Figura 7).

Figura 7 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier em função do genótipo do BRAF para doentes com carcinoma papilar da tiroide



NRAS – Frequência das mutações

A frequência de mutações do NRAS nos diferentes histotipos é apresentada na Tabela 23. Todas as alterações encontradas dizem respeito a mutações no codão 61.

Tabela 23 - Frequência de mutações do NRAS nos diferentes histotipos

	Total	CPT	CFT	CPDT	CAT
NRAS (n)	426	301	64	27	34
wild-type	380 (89,2)	286 (95,0)	50 (78,1)	19 (70,4)	25 (73,5)
mutado	46 (10,8)	15 (5,0)	14 (21,9)	8 (29,6)	9 (26,5)

Os números entre parêntesis representam percentagens para cada categoria

CPT – carcinoma papilar da tiroide, CFT – carcinoma folicular da tiroide, CPDT – carcinoma pouco diferenciado da tiroide, CAT – carcinoma anaplásico da tiroide

Nos casos de carcinoma papilar, a frequência da mutação foi de 5 em 222 (2,3%) na forma clássica e de 9 em 68 (13,2%) na variante folicular.

NRAS e fatores clínico-patológicos

Uma vez que estas mutações estão sobretudo presentes no carcinoma folicular, na variante folicular do carcinoma papilar, no carcinoma pouco diferenciado e no carcinoma anaplásico, optou-se por apresentar a relação com os fatores clínico-patológicos nos seguintes grupos: carcinoma diferenciado com morfotipo folicular (incluindo a variante folicular do carcinoma papilar e o carcinoma folicular), variante folicular do carcinoma papilar, carcinoma folicular e carcinomas «menos diferenciados» (carcinoma pouco diferenciado e carcinoma anaplásico) (Tabela 24).

Tabela 24 - Sumário da relação entre as mutações do NRAS e as características clínico-patológicas

Histotipo		Total	NRAS wild type	NRAS mutado	p
Carcinomas diferenciados com morfotipo folicular	Idade no diagnóstico (n=107)	49,2±15,3	49,1±15,6	50,5±14,9	NS (0,73)
	Género (n=107)				
foliular do carcinoma papilar + carcinoma folicular)	Feminino	81 (75,7)	69 (79,3)	12 (60,0)	NS (0,07)
	Masculino	26 (24,3)	18 (20,7)	8 (40,0)	
foliular do carcinoma papilar + carcinoma folicular)	Tamanho do tumor, cm (n=99)	3,2±2,1	3,1±2,0	3,6±2,5	NS (0,45)
	Extensão extratiroideia (n=75)				
foliular do carcinoma papilar + carcinoma folicular)	Presente	30 (40,0)	25 (39,7)	5 (41,7)	NS (0,89)
	Invasão vascular (n=86)				
foliular do carcinoma papilar + carcinoma folicular)	Presente	48 (55,8)	35 (52,2)	13 (68,4)	NS (0,21)

(n=148)	Metástases ganglionares (n=84)				
	Presentes	31 (36,9)	26 (38,2)	5 (31,3)	NS (0,60)
	Metástases à distância (n=73)				
	Presentes	16 (21,9)	14 (23,0)	2 (16,7)	NS (0,63)
	Estádio UICC/AJCC (n=64)				
	I	27 (42,2)	19 (36,5)	8 (66,7)	NS (0,17)
	II	11 (17,2)	11 (21,2)	0	
	III	10 (15,6)	8 (15,4)	2 (16,7)	
	IV	16 (25,0)	14 (26,9)	2 (16,7)	
Variante folicular do carcinoma papilar (n=78)	Idade no diagnóstico (n=69)	47,0±15,3	47,7±15,5	44,2±14,7	NS (0,53)
	Gênero (n=69)				
	Feminino	56 (81,2)	50 (83,3)	6 (66,7)	NS (0,23)
	Masculino	13 (18,8)	10 (16,7)	3 (33,3)	
	Tamanho do tumor, cm (n=67)	2,6±1,6	2,6±1,6	2,2±0,7	NS (0,42)
	Extensão extratiroideia (n=49)				
	Presente	24 (49,0)	22 (50,0)	2 (40,0)	NS (0,67)
	Invasão vascular (n=53)				
	Presente	20 (37,7)	16 (35,6)	4 (50,0)	NS (0,44)
	Metástases ganglionares (n=54)				
	Presentes	24 (44,4)	22 (46,8)	2 (28,6)	NS (0,36)
	Metástases à distância (n=53)				
	Presentes	10 (18,9)	8 (17,8)	2 (25,0)	NS (0,63)
Estádio UICC/AJCC (n=45)					
I	21 (46,7)	15 (40,5)	6 (75,0)	NS (0,19)	
II	7 (15,6)	7 (18,9)	0		
III	7 (15,6)	7 (18,9)	0		
IV	10 (22,2)	8 (21,6)	2 (25,0)		
Carcinoma folicular (n=70)	Idade no diagnóstico (n=63)	51,8±16,4	53,1±16,2	49,2±17,7	NS (0,44)
	Gênero (n=63)				
	Feminino	46 (73,0)	38 (77,6)	8 (57,1)	NS (0,13)
	Masculino	17 (27,0)	11 (22,4)	6 (42,9)	
	Tamanho do tumor, cm (n=56)	4,4±2,6	4,5±2,7	4,2±2,8	NS (0,70)
	Extensão extratiroideia (n=47)				
	Presente	8 (17,0)	5 (13,5)	3 (30,0)	NS (0,22)
	Invasão vascular (n=52)				
	Presente	39 (75,0)	29 (74,4)	10 (76,9)	NS (0,85)
	Metástases ganglionares (n=44)				
	Presentes	8 (18,2)	5 (15,2)	3 (27,3)	NS (0,37)
	Metástases à distância (n=28)				
	Presentes	6 (21,4)	6 (25,0)	0	NS (0,26)
Estádio UICC/AJCC (n=26)					

	I	7 (26,9)	5 (22,7)	2 (50,0)	NS (0,12)
	II	8 (30,8)	8 (36,4)	0	
	III	5 (19,2)	3 (13,6)	2 (50,0)	
	IV	6 (23,1)	6 (27,3)	0	
<hr/>					
Carcinomas «menos diferenciados» (carcinoma pouco diferenciado + anaplásico) (n=67)	Idade no diagnóstico (n=60)	61,5±16,2	61,9±16,4	60,2±17,2	NS (0,73)
	Género (n=59)				
	Feminino	37 (62,7)	26 (61,9)	11 (64,7)	NS (0,84)
	Masculino	22 (37,3)	16 (38,1)	6 (35,3)	
	Tamanho do tumor, cm (n=39)	6,5±3,2	6,4±3,2	6,1±3,6	NS (0,79)
	Extensão extratiroideia (n=53)				
	Presente	45 (84,9)	33 (89,2)	12 (75,0)	NS (0,19)
	Invasão vascular (n=14)				
	Presente	14 (100,0)	10(100,0)	4 (100,0)	a)
	Metástases ganglionares (n=43)				
	Presentes	23 (53,5)	15 (51,7)	8 (57,1)	NS (0,74)
	Metástases à distância (n=40)				
	Presentes	29 (72,5)	18 (64,3)	11 (91,7)	NS (0,08)
Estádio UICC/AJCC (n=52)					
I	2 (3,8)	1 (2,6)	1 (7,7)	NS (0,55)	
II	3 (5,8)	2 (5,1)	1 (7,7)		
III	4 (7,7)	4 (10,3)	0		
IV	43 (82,7)	32 (82,1)	11 (84,6)		

n – número de doentes com dados disponíveis para cada categoria

Os números entre parêntesis representam percentagens em cada categoria.

a) Não se procedeu ao teste estatístico em virtude de existirem números constantes numa categoria.

Não foi encontrada nenhuma associação entre a mutação do *NRAS* e qualquer das características clínico-patológicas estudadas nos diferentes grupos.

NRAS e resposta ao tratamento

Quando se consideraram os carcinomas diferenciados (variante folicular do carcinoma papilar e carcinoma folicular), não se encontrou relação entre a presença de mutação do *NRAS* e o número de terapêuticas com ¹³¹I, a atividade cumulativa de ¹³¹I ou o número de outras modalidades terapêuticas (Tabela 25).

Tabela 25 - Relação entre os procedimentos terapêuticos e a mutação do NRAS

	Total	NRAS wt	NRAS mutado	p
Número de terapêuticas com ¹³¹ I	1,56±1,06	1,53±1,06	1,50±1,27	NS (0,93)
Atividade cumulativa (mCi)	222,0±247,8	214,3±237,1	262,3±391,5	NS (0,65)
Número de outras terapêuticas	0,81±1,54	0,81±1,57	0,56±1,67	NS (0,66)

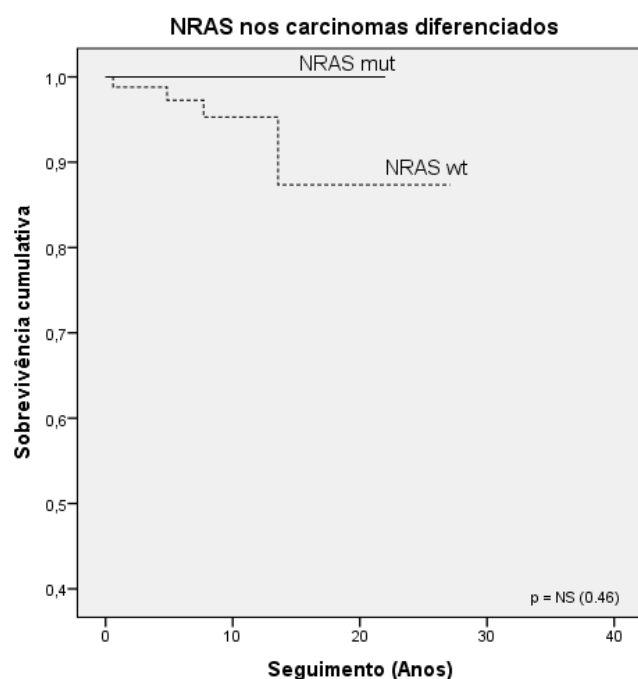
NRAS e doença persistente no final do seguimento

Quando considerámos o grupo de carcinomas diferenciados para a análise do NRAS (variante folicular do carcinoma papilar e carcinoma folicular), os doentes com tumores NRAS wt apresentaram maior frequência de doença persistente (23,2%) quando comparados com os doentes com tumores com mutação do NRAS (8,3%), mas a diferença não atingiu o limiar da significância estatística ($p=0,25$).

NRAS e mortalidade específica pelo carcinoma da tiroide

A mortalidade específica dos doentes com carcinomas diferenciados (variante folicular do carcinoma papilar e carcinoma folicular) com e sem mutação do NRAS foi semelhante (Figura 8).

Figura 8 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier em função do genótipo do NRAS para doentes com carcinomas diferenciados da tiroide



4.2.3. – Contribuição para o esclarecimento da oncobiologia dos carcinomas da tireoide de diferenciação folicular, através do estudo da frequência de uma nova alteração molecular presente nestes tumores, as mutações no promotor do *TERT*

Após a descrição de mutações no promotor do *TERT* em melanomas, procedeu-se ao estudo da frequência destas alterações genéticas numa série de 647 amostras tiroideias, incluindo tecido tiroideu normal, patologia benigna e maligna. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Diagnóstico histológico das 647 amostras de tecido tiroideu analisadas para a presença de mutações no promotor do TERT e respetivas percentagens

Classificação histológica	Nº de casos	TERT n (%)
Tecido tiroideu normal	30	0 (0,0)
Tiroidite linfocítica	9	0 (0,0)
Bócio nodular	12	0 (0,0)
Adenoma folicular		
Convencional	53	0 (0,0)
Variante oncocítica	7	0 (0,0)
Carcinoma folicular		
Convencional	43	12 (27,9)
Variante oncocítica	27	0 (0,0)
Carcinoma papilar		
Convencional	230	19 (8,3)
Variante folicular	74	5 (6,8)
Variante oncocítica		
Padrão papilar	6	0 (0,0)
Padrão folicular	3	0 (0,0)
Variante sólida	7	0 (0,0)
Variante «Warthin-like»	6	0 (0,0)
Variante células altas	2	0 (0,0)
Carcinoma mucoepidermóide	4	1 (25,0)
Carcinoma pouco diferenciado	31	9 (29,0)
Carcinoma anaplásico	36	12 (33,3)
Carcinoma medular	28	0 (0,0)
Série de Chernobyl		
Adenomas foliculares	12	0 (0,0)
Carcinomas papilares	27	0 (0,0)

Não foram encontradas mutações no promotor do *TERT* em lesões benignas (tiroidites, adenomas, bócios nodulares) nem em carcinomas medulares. Também não foram encontradas mutações em nenhuma variante oncócica dos carcinomas papilar ou folicular, assim como em nenhum tumor da série de Chernobyl. Isto é, apenas se encontraram mutações no promotor do *TERT* em carcinomas da tiroide com diferenciação folicular. A sua frequência de acordo com o histotipo principal é apresentada na Tabela 27:

Tabela 27 - Frequência das mutações no promotor do TERT nos principais histotipos de carcinomas da tiroide de diferenciação folicular

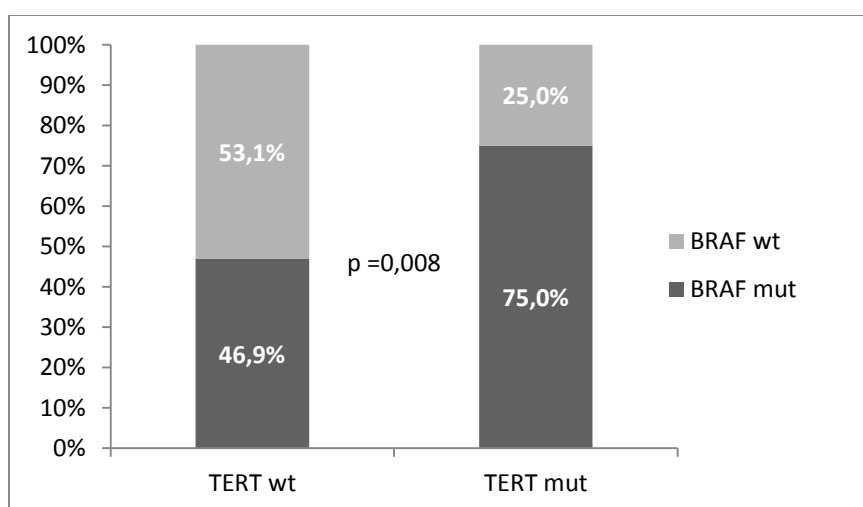
	Total	CPT	CFT	CPDT	CAT
TERT (n)	469	332	70	31	36
wild-type	411 (87,6)	307 (92,5)	58 (82,9)	22 (71,0)	24 (66,7)
mutado	58 (12,4)	25 (7,5)	12 (17,1)	9 (29,0)	12 (33,3)

Os números entre parêntesis representam percentagens para cada categoria
 CPT – carcinoma papilar da tiroide, CFT – carcinoma folicular da tiroide, CPDT – carcinoma pouco diferenciado da tiroide, CAT – carcinoma anaplásico da tiroide

As mutações no promotor do *TERT* foram ligeiramente mais frequentes na forma clássica do carcinoma papilar (8,3%) do que na variante folicular (6,8%). A maioria dos tumores mutados (48 em 58; 82,8%) apresentavam a alteração -124G>A e os restantes 10 a alteração -146G>A.

Nos carcinomas papilares, a mutação no promotor do *TERT* foi mais frequente nos tumores que apresentavam mutação do *BRAF* (46,9% vs 75,0%; $p=0,008$) (Figura 9).

Figura 9 - Frequência relativa das mutações do BRAF em carcinomas papilares com promotor do TERT wild-type e mutado

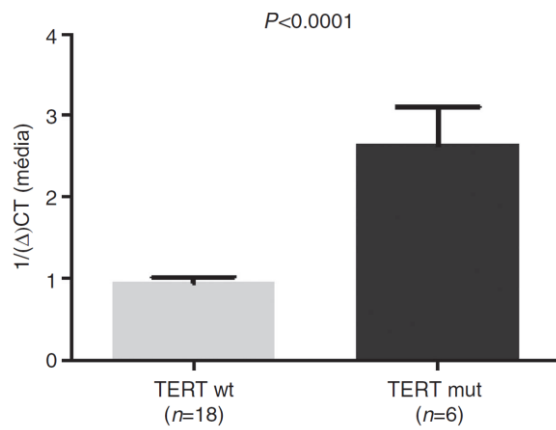


wt – wild-type, mut – mutação

Relação entre a presença das mutações no promotor do *TERT* com a expressão do mRNA do *TERT*

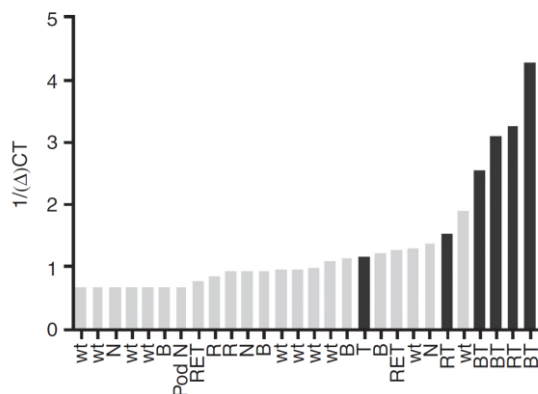
Numa subamostra constituída por 24 tumores, realizámos um RT-PCR quantitativo para avaliar a expressão do mRNA do *TERT*. Verificámos que os tumores que apresentavam mutações no promotor do *TERT* tinham níveis significativamente mais elevados de mRNA (Figura 10). De entre os tumores com mutação no promotor do *TERT*, aqueles que apresentavam expressão mais elevada eram os que concomitantemente tinham mutação do *BRAF* (Figura 11).

Figura 10 - Quantificação dos níveis de expressão do mRNA do *TERT* em tumores com e sem mutação no promotor



wt – wild-type, mut – mutação

Figura 11 - Quantificação da expressão do mRNA do *TERT* em tecido tiroideu normal e em carcinomas com diferentes alterações genéticas



N – tecido tiroideu normal, wt – carcinomas sem alterações genéticas conhecidas, B – carcinomas com mutação do *BRAF*, RET – carcinomas com rearranjo do *RET*, R – carcinomas com mutação do *RAS*, T – carcinomas com mutação no promotor do *TERT*, BT – carcinomas com mutação do *BRAF* e *TERT*, RT – carcinomas com mutação do *RAS* e *TERT*. As barras a preto representam tumores com mutação no promotor do *TERT*.

4.2.4. – Mutações no promotor do *TERT* como indicadores de prognóstico

Relação entre a presença de mutações do promotor do TERT e fatores clínico-patológicos

No grupo de doentes com carcinomas diferenciados da tiroide, a presença de mutações no promotor do *TERT* associou-se significativamente a idade mais avançada dos doentes ($p < 0,001$) e maior tamanho do tumor ($p = 0,002$) (Tabela 28). Os doentes com tumores mutados no promotor do *TERT* apresentaram também maior frequência de metástases à distância ($p < 0,001$) e estádios mais elevados ($p < 0,001$). Não se encontrou associação entre a presença das mutações no promotor do *TERT* e a presença de invasão vascular, extensão extratiroideia ou metástases ganglionares.

No grupo de doentes com carcinoma papilar, a presença de mutações no promotor do *TERT* associou-se com idade mais avançada no diagnóstico ($p < 0,001$), maior tamanho do tumor ($p = 0,005$) e estádios mais elevados ($p = 0,02$). Embora os doentes com tumores com mutações no promotor do *TERT* tenham apresentado metástases à distância mais frequentemente do que os doentes com tumores wt para o promotor da *TERT* (27,8% vs 14,7%), a diferença não atingiu o limiar da significância estatística ($p = 0,07$).

No grupo de doentes com carcinoma folicular, as mutações no promotor do *TERT* associaram-se com idade mais avançada dos doentes ($p = 0,004$), estádios mais avançados ($p = 0,007$) e metástases à distância ($p < 0,001$).

No grupo de doentes com carcinoma pouco diferenciado ou anaplásico, a presença de mutações no promotor do *TERT* associou-se com idade mais avançada no diagnóstico ($p = 0,003$) e género feminino ($p = 0,02$).

Tabela 28 - Sumário das associações entre as mutações no promotor do TERT com fatores clínico-patológicos e moleculares

Histotipo		Total	<i>TERT</i> wt	<i>TERT</i> mutado	p
Carcinomas diferenciados da tiroide (n=402)	Fatores clínico-patológicos				
	Idade no diagnóstico (n=402)	46,0±16,0	44,5±15,6	60,2±12,7	<0,001
	Género (n=395)				
	Feminino	304 (77,0)	278 (77,7)	26 (70,3)	NS (0,31)
	Masculino	91 (23,0)	80 (22,3)	11 (29,7)	
	Tamanho do tumor, cm (n=376)	2,7±1,9	2,6±1,8	3,6±2,3	0,002
	Extensão extratiroideia (n=317)				
	Presente	184 (58,0)	167 (57,4)	17 (65,4)	NS (0,43)
	Invasão vascular (n=310)				
	Presente	142 (45,8)	129 (45,4)	13 (50,0)	NS (0,65)
Metástases ganglionares (n=345)					
Presentes	210 (60,9)	189 (61,0)	21 (60,0)	NS (0,91)	
Metástases à distância (n=294)					
Presentes	44 (15,0)	34 (12,5)	10 (43,5)	<0,001	

	Estádio UICC/AJCC (n=254)				
	I	132 (52,0)	129 (55,1)	3 (15,0)	<0,001
	II	33 (13,0)	31 (13,3)	2 (10,0)	
	III	41 (16,1)	37 (15,8)	4 (20,0)	
	IV	48 (18,9)	37 (15,8)	11 (55,0)	
	Outras alterações genéticas				
	Mutações <i>BRAF</i> (n=357)	148 (41,5)	130 (40,2)	18 (52,9)	NS (0,15)
	Mutações <i>NRAS</i> (n=365)	29 (7,9)	24 (7,3)	5 (14,3)	NS (0,15)
Carcinomas papilares da tiroide (n=332)	Fatores clínico-patológicos				
	Idade no diagnóstico (n=332)	44,8±15,6	43,6±15,3	58,4±13,2	<0,001
	Gênero (n=327)				
	Feminino	254 (77,7)	237 (78,5)	17 (68,0)	NS (0,23)
	Masculino	73 (22,3)	65 (21,5)	8 (32,0)	
	Tamanho do tumor, cm (n=315)	2,4±1,5	2,3±1,4	3,2±2,2	0,005
	Extensão extratiroideia (n=268)				
	Presente	176 (65,7)	162 (64,8)	14 (77,8)	NS (0,26)
	Invasão vascular (n=257)				
	Presente	103 (40,1)	98 (40,7)	5 (31,3)	NS (0,46)
	Metástases ganglionares (n=298)				
	Presentes	202 (67,8)	184 (66,9)	18 (78,3)	NS (0,26)
	Metástases à distância (n=263)				
	Presentes	36 (13,7)	31 (14,7)	5 (27,8)	NS (0,07)
	Estádio UICC/AJCC (n=225)				
	I	124 (55,1)	121 (57,3)	3 (21,4)	0,02
	II	25 (11,1)	24 (11,4)	1 (7,1)	
III	36 (16,0)	32 (15,2)	4 (28,6)		
IV	40 (17,8)	34 (16,1)	6 (42,9)		
	Outras alterações genéticas				
	Mutações <i>BRAF</i> (n=301)	148 (49,2)	130 (46,9)	18 (75,0)	0,008
	Mutações <i>NRAS</i> (n=301)	15 (5,0)	14 (5,1)	1 (4,2)	NS (0,85)
Carcinomas foliculares da tiroide (n=70)	Fatores clínico-patológicos				
	Idade no diagnóstico (n=70)	51,8±16,4	49,3±16,3	63,8±11,0	0,004
	Gênero (n=68)				
	Feminino	50 (73,5)	41 (73,2)	9 (75,0)	NS (0,90)
	Masculino	18 (26,5)	15 (26,8)	3 (25,0)	
	Tamanho do tumor, cm (n=61)	4,4±2,6	4,4±2,6	4,4±2,5	NS (0,96)
	Extensão extratiroideia (n=49)				
	Presente	8 (16,3)	5 (12,2)	3 (37,5)	NS (0,08)
Invasão vascular (n=53)					
Presente	39 (73,6)	31 (72,1)	8 (80,0)	NS (0,61)	

	Metástases ganglionares (n=47)				
	Presentes	8 (17,0)	5 (14,3)	3 (25,0)	NS (0,39)
	Metástases à distância (n=31)				
	Presentes	8 (25,8)	3 (11,5)	5 (100,0)	<0,001
	Estádio UICC/AJCC (n=29)				
	I	8 (27,6)	8 (34,8)	0	0,007
	II	8 (27,6)	7 (30,4)	1 (16,7)	
	III	5 (17,2)	5 (21,7)	0	
	IV	8 (27,6)	3 (13,1)	5 (83,3)	
	Outras alterações genéticas				
	Mutações <i>BRAF</i> (n=56)	0	0	0	a)
	Mutações <i>NRAS</i> (n=64)	14 (21,9)	10 (18,9)	4 (36,4)	NS (0,20)
Carcinomas «menos diferenciados» (carcinoma pouco diferenciado + anaplásico) (n=67)	Fatores clínico-patológicos				
	Idade no diagnóstico (n=67)	61,5±16,2	58,3±17,6	68,7±9,6	0,003
	Gênero (n=64)				
	Feminino	38 (59,4)	22 (50,0)	16 (80,0)	0,02
	Masculino	26 (40,6)	22 (50,0)	4 (20,0)	
	Tamanho do tumor, cm (n=42)	6,5±3,2	6,3±3,4	6,8±2,9	NS (0,62)
	Extensão extratiroideia (n=56)				
	Presente	47 (83,9)	32 (82,1)	15 (88,2)	NS (0,56)
	Invasão vascular (n=15)				
	Presente	15 (100,0)	11(100,0)	4 (100,0)	a)
	Metástases ganglionares (n=46)				
	Presentes	24 (52,2)	16 (57,1)	8 (44,4)	NS (0,40)
	Metástases à distância (n=43)				
	Presentes	32 (74,4)	19 (70,4)	13 (81,3)	NS (0,43)
	Estádio UICC/AJCC (n=56)				
	I	2 (3,6)	2 (5,3)	0	NS (0,39)
	II	3 (5,4)	3 (7,9)	0	
III	4 (7,1)	2 (5,3)	2 (11,1)		
IV	47 (83,9)	31 (81,5)	16 (88,9)		
	Outras alterações genéticas				
	Mutações <i>BRAF</i> (n=65)	10 (15,4)	6 (13,6)	4 (19,0)	NS (0,57)
	Mutações <i>NRAS</i> (n=61)	17 (27,9)	9 (22,5)	8 (38,1)	NS (0,20)

n – número de doentes com dados disponíveis para cada categoria.

Os números entre parêntesis representam percentagens em cada categoria.

a) Não se procedeu ao teste estatístico em virtude de existirem números constantes numa categoria.

Mutações no promotor do TERT e metastização à distância

Face à existência de uma associação estatisticamente significativa entre as mutações no promotor do *TERT* e a metastização à distância em carcinomas diferenciados da tiroide, e tendo

em conta que a presença de metástases à distância tem importantes implicações no prognóstico dos doentes, realizou-se um modelo de regressão logística multivariado para identificação dos fatores associados com metastização à distância.

Os resultados estão sumariados na Tabela 29.

Tabela 29 - Fatores preditivos clínico-patológicos e moleculares para metástases à distância em doentes com carcinomas diferenciados da tireoide

	Presença (%)	Análise univariada		Análise multivariada	
		OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
Total	44 (15,0)				
Idade					
<45 anos	17 (11,5)	1 (ref)	NS		
>45 anos	27 (18,5)	1,75 (0,91-3,37)	(0,09)		
Género					
Feminino	28 (12,4)	1	0,02	1	0.03
Masculino	16 (24,6)	2,31 (1,16-4,60)		2.32 (1.10-4.90)	
Tamanho do tumor		1,28 (1,07-1,54)	0,009	1.18 (0.97-1.44)	0.10
Extensão extratiroideia					
Não	14 (15,1)	1	NS		
Sim	22 (14,3)	0,94 (0,46-1,94)	(0,87)		
Invasão vascular					
Não	10 (7,2)	1	<0,001	***	
Sim	22 (23,4)	3,94 (1,77-8,78)			
Metástases ganglionares					
N0/Nx	17 (17,9)	1	NS (0,64)		
N1	27 (15,7)	0,85 (0,44-1,66)			
BRAF*					
wt	21 (17,2)	1	NS		
mut	14 (12,1)	0,66 (0,32-1,37)	(0,26)		
TERT					
wt	34 (12,5)	1	<0,001	1	0,002
mut	10 (43,5)	5,36 (2,18-13,18)		4,60 (1,73-12,21)	

n =294

wt – *wild-type*, mut – mutação

*O tamanho do tumor foi incluído no modelo como uma variável contínua

**A análise do *BRAF* apenas foi realizada no grupo de doentes com carcinoma papilar

***A invasão vascular não foi considerada no modelo patente na tabela.

Para além das mutações no promotor do *TERT* (OR =5,36; p <0,001), associaram-se com a presença de metástases à distância o género masculino (OR =2,31; p =0,02), o maior tamanho do tumor (OR =1,28; p =0,009) e a presença de invasão vascular (OR =3,94; p <0,001). O valor preditivo das mutações no promotor do *TERT* manteve-se depois de se ajustar para a invasão vascular (OR ajustado =3,54; p =0,04) e para a invasão vascular e para o género (OR ajustado =3,51; p =0,04). O valor preditivo das mutações do promotor do *TERT* foi também independente

do género e tamanho do tumor (OR ajustado =4,60; p =0,002). No entanto, quando todos os fatores clínico-patológicos e moleculares associados com metastização à distância (género, tamanho do tumor, mutações no promotor do *TERT* e invasão vascular) foram introduzidos no modelo multivariado, a invasão vascular tornou-se o único fator preditivo independente para metastização à distância, com um OR ajustado para o género, tamanho do tumor e mutações do promotor do *TERT* de 3,38 (1,42-8,04); p =0,006.

Mutações no promotor do TERT e resposta ao tratamento

Os doentes com carcinomas diferenciados da tiroide que apresentavam mutações no promotor do *TERT* foram submetidos a mais tratamentos com ¹³¹I, nos quais foram utilizadas atividades terapêuticas mais elevadas (Tabela 30). O grupo de doentes com tumores mutados no promotor do *TERT* foi também submetido a um número significativamente maior de outras modalidades terapêuticas.

Tabela 30 - Relação entre os procedimentos terapêuticos e as mutações do promotor do TERT

	Total	TERT wt	TERT mut	p
Número de terapêuticas com ¹³¹I	1,96±1,29	1,81±1,16	2,69±1,78	0,009
Atividade cumulativa (mCi)	9,8±8,9/ 264,1±240,4	9,0±8,1/ 242,8±218,1	15,8±12,4/ 425,8±334,8	0,004
Número de outras terapêuticas	1,36±1,73	1,13±1,52	2,56±2,45	0,001

wt – wild-type, mut – mutação

Mutações no promotor do TERT e doença persistente no final do seguimento

No final do seguimento, os doentes com carcinomas diferenciados que apresentavam mutação no promotor do *TERT* tiveram maior propensão para terem doença persistente (OR =5,10; p =0,001) (Tabela 31). O género masculino (OR =2,10; p =0,04) e a existência de metástases ganglionares (OR =1,95; p= 0,04) foram os outros fatores associados a doença persistente. No modelo multivariado, as mutações do promotor do *TERT* constituíram um fator preditivo independente para a persistência de doença no final do seguimento (OR ajustado =4,68; p =0,007).

Tabela 31 - Fatores preditivos clínico-patológicos e moleculares para doença persistente no final do seguimento em doentes com carcinomas diferenciados da tiroide

	Presença (%)	Análise univariada		Análise multivariada	
		OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
Total	58 (27,5)				
Idade					
<45 anos	25 (22,9)	1 (ref)	NS		
>45 anos	33 (32,4)	1,61 (0,87-2,96)	(0,13)		

Gênero					
Feminino	42 (24,9)	1	0,04	1	0,03
Masculino	16 (41,0)	2,10 (1,02-4,35)		2,46 (1,11-5,47)	
Tamanho do tumor		1,28 (1,07-1,54)	0,009	1,18 (0,97-1,43)	NS (0,10)
Extensão extratiroideia					
Não	22 (24,4)	1	NS		
Sim	28 (35,9)	1,73 (0,89-3,27)	(0,11)		
Invasão vascular					
Não	16 (20,0)	1	NS		
Sim	22 (32,8)	1,96 (0,93-4,13)	(0,08)		
Metástases ganglionares					
N0/Nx	21 (23,3)	1	0,04	1	0,03
N1	35 (37,2)	1,95 (1,03-3,71)		2,16 (1,10-4,25)	
BRAF*					
wt	20 (22,7)	1	NS		
mut	26 (37,1)	2,00 (1,00-4,03)	(0,05)		
TERT					
wt	48 (24,6)	1	0,001	1	0,007
mut	10 (62,5)	5,10 (1,76-14,78)		4,68 (1,54-14,27)	

n =211

wt – *wild-type*, mut – *mutação*

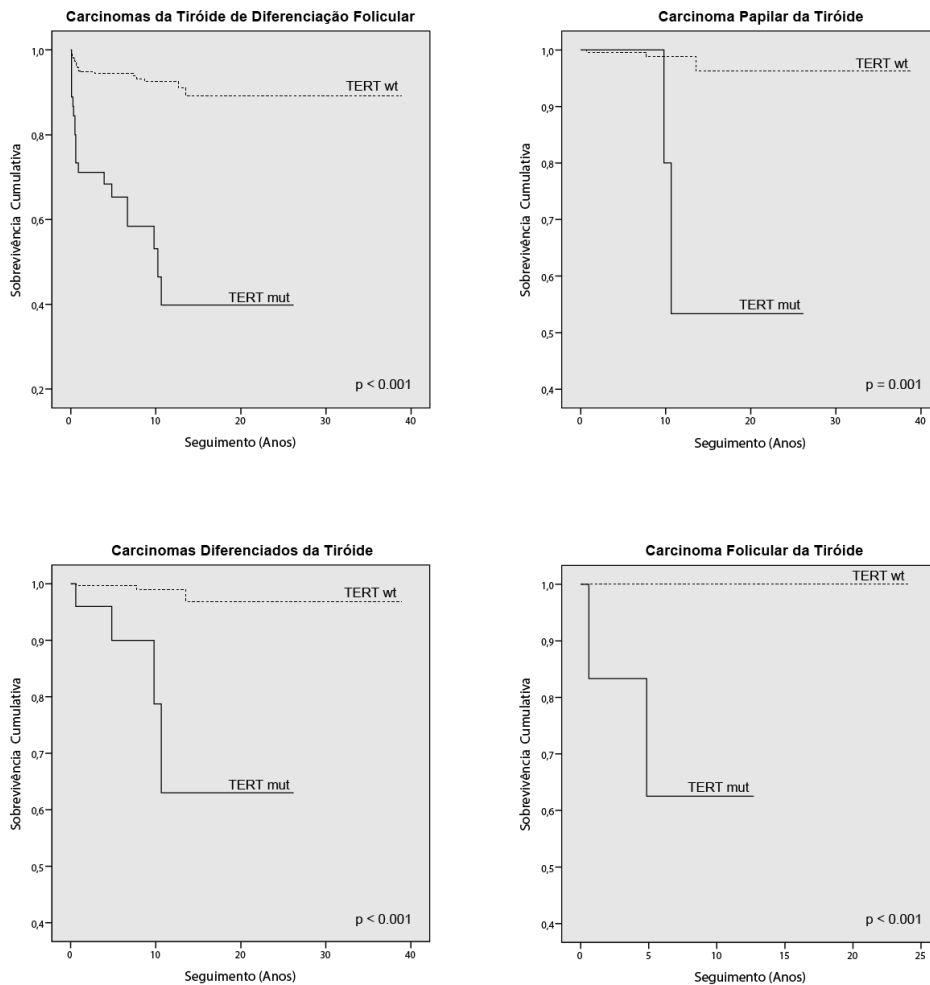
*O tamanho do tumor foi incluído no modelo como uma variável contínua.

**A análise do *BRAF* apenas foi realizada no grupo de doentes com carcinoma papilar.

Mutações no promotor do TERT e mortalidade específica pelo carcinoma da tireoide

A análise de sobrevivência de Kaplan-Meier mostrou que a presença de mutações no promotor do *TERT* se associava a maior mortalidade específica pelo carcinoma na globalidade da amostra (carcinomas com diferenciação folicular) ($p < 0,001$), assim como nos grupos de doentes com carcinomas diferenciados da tireoide ($p < 0,001$), com carcinoma papilar ($p = 0,01$) ou com carcinoma folicular ($p < 0,001$) (Figura 12 e Tabela 32). A idade superior a 45 anos no diagnóstico e a presença de metástases à distância foram as outras características clínico-patológicas significativamente associadas a mortalidade aumentada (descrito no capítulo «Fatores clínico-patológicos e mortalidade específica pelo carcinoma da tireoide»).

Figura 12 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para mortalidade específica pelo carcinoma da tireoide de acordo com o genótipo do promotor do *TERT*



wt – wild-type, mut - mutação

Na análise de regressão de Cox (Tabela 32), o *Hazard Ratio* (HR) para mortalidade pelo carcinoma diferenciado da tireoide nos doentes com tumores com mutação no promotor do *TERT* foi 19,42 (IC 95% =4,30-87,64); depois de se ajustar para a idade e para o género, o HR foi 10,35 (IC 95% =2,01-53,24). No subgrupo de doentes com carcinoma papilar, o HR conferido pela presença de mutações do promotor do *TERT* foi 11,63 (IC 95% = 1,93-70,15); depois de se ajustar para a idade e para o género, o HR foi 23,81 (IC 95% = 1,36-415,76). O reduzido número de óbitos no subgrupo de doentes com carcinoma folicular não permitiu uma análise de regressão semelhante à realizada no subgrupo de doentes com carcinoma papilar.

Tabela 32 - Mortalidade específica pelo carcinoma da tiroide e Hazard Ratios de acordo com o genótipo do promotor do TERT

Grupo	Mortalidade, n (%)				Taxa de mortalidade (mortes por 1000 pessoa-anos)		Hazard Ratio (95% CI)			
	Total	TERT wt	TERT mut	p*	TERT wt	TERT mut	Não ajustado	p	Ajustado**	p
CDT	7/323 (2,2)	3/298 (1,0)	4/25 (16,0)	<0,001	1,17	21,17	19,42 (4,30-87,64)	<0,001	10,35 (2,01-53,24)	0,005
CPT	5/284 (1,8)	3/265 (1,1)	2/19 (10,5)	0,001	1,36	13,64	11,63 (1,93-70,15)	0,007	23,81 (1,36-415,76)	0,03
CFT	2/70 (2,8)	0/58	2/12 (16,7)	<0,001	0	47,23	***	***	***	***

*log-rank (Kaplan-Meier)

**Ajustado para idade e género (regressão de Cox)

***Devido ao número reduzido de óbitos no grupo de doentes com carcinoma folicular, não foi realizada uma análise de regressão neste grupo
wt – *wild*-type, mut – mutação, CDT – Carcinoma diferenciado da tiroide, CPT – Carcinoma papilar da tiroide, CFT – Carcinoma folicular da tiroide

Interação entre as mutações no promotor do TERT e do BRAF na determinação do comportamento biológico dos tumores e prognóstico dos doentes

No grupo de doentes com tumores que apresentavam mutação no promotor do *TERT*, procedeu-se à comparação das características clínico-patológicas e mortalidade entre aqueles que simultaneamente apresentavam mutação do *BRAF* e os que eram wt para o *BRAF* (Tabela 33 e Figura 13). Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois subgrupos.

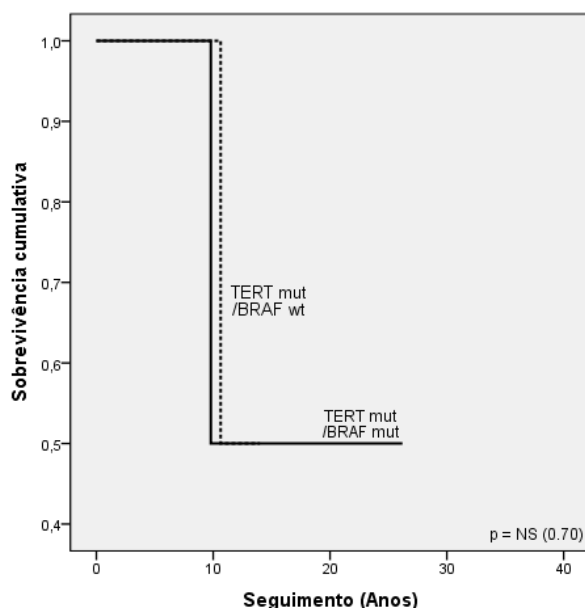
Tabela 33 - Características clínico-patológicas, estado no final do seguimento e mortalidade específica em carcinomas papilares com mutação no promotor do TERT, de acordo com o genótipo do BRAF

	Total	<i>TERT</i> mut / <i>BRAF</i> wt	<i>TERT</i> mut / <i>BRAF</i> mut	p
Fatores clínico-patológicos				
Idade no diagnóstico (n=24)	58,4±13,2	52,2±8,0	60,0±14,4	NS (0,22)
Género (n=24)				
Feminino	16 (66,7)	5 (83,3)	11 (61,1)	NS (0,32)
Masculino	8 (33,3)	1 (16,7%)	7 (38,9)	
Tamanho do tumor, cm (n=23)	3,2±2,2	2,9±2,1	3,3±2,3	NS (0,66)
Extensão extratiroideia (n=18)				
Presente	14 (77,8)	3 (60,0)	11 (84,6)	NS (0,26)
Invasão vascular (n=16)				
Presente	5 (31,3)	2 (66,7)	3 (23,1)	NS (0,14)
Metástases ganglionares (n=23)				
Presentes	18 (78,3)	5 (83,3)	13 (76,5)	NS (0,73)
Metástases à distância (n=18)				
Presentes	5 (27,8)	3 (50,0)	2 (16,7)	NS (0,14)
Estádio (n=14)				
I	3 (21,4)	0	3 (37,5)	NS (0,29)
II	1 (7,1)	1 (16,7)	0	
III	4 (28,6)	2 (33,3)	2 (25,0)	
IV	6 (42,9)	3 (50,0)	3 (37,5)	
Estado clínico no final do seguimento (n=12)				
Persistência de doença	6 (50,0)	4 (66,7)	2 (33,3)	NS (0,25)
Mortalidade específica (n=19)	2 (10,5)	1 (16,7)	1 (7,7)	NS (0,70)*

*log-rank (Kaplan-Meier)

wt – *wild-type*, mut - mutação

Figura 13 - Curva de sobrevivência específica de Kaplan-Meier relativa ao grupo de doentes com carcinomas papilares com mutações no promotor do TERT, de acordo com o genótipo do BRAF



Interação entre as mutações no promotor do TERT e do NRAS na determinação do comportamento biológico dos tumores e prognóstico dos doentes

No grupo de doentes com tumores que apresentavam mutação no promotor do TERT, procedeu-se também à comparação das características clínico-patológicas e mortalidade entre aqueles que simultaneamente apresentavam mutação do NRAS e os que eram wt para o NRAS (Tabela 34 e Figura 14). Não foram encontradas diferenças significativas.

Tabela 34 - Características clínico-patológicas, estado no final do seguimento e mortalidade específica em carcinomas papilares com mutação no promotor do TERT, de acordo com o genótipo do NRAS

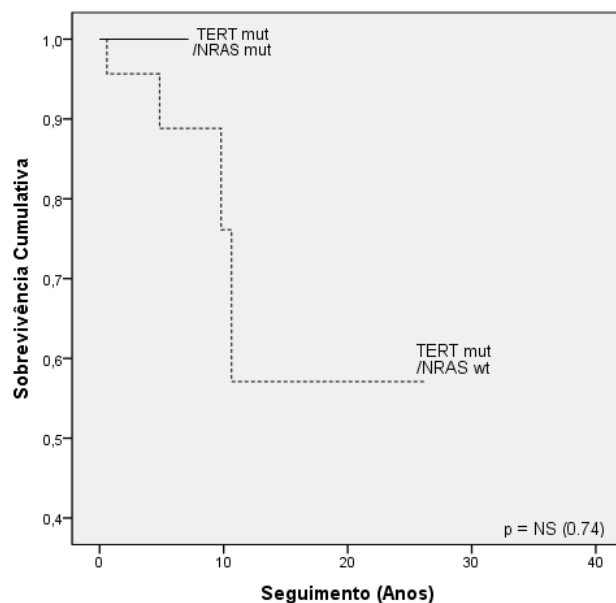
	Total	TERT mut / NRAS wt	TERT mut / NRAS mut	P
Fatores clínico-patológicos				
Idade no diagnóstico (n=35)	60,2±12,7	60,1±13,4	60,4±10,6	NS (0,95)
Género (n=35)				
Feminino	24 (68,6)	20 (83,3)	4 (80,0)	NS (0,55)
Masculino	11(31,4)	10 (16,7)	1 (20,0)	
Tamanho do tumor, cm (n=34)	3,6±2,3	3,4±2,0	4,7±3,9	NS (0,51)
Extensão extratiroideia (n=25)				
Presente	17 (68,0)	15 (68,2)	2 (66,7)	NS (0,96)
Invasão vascular (n=26)				
Presente	13 (50,0)	10 (45,5)	3 (75,0)	NS (0,28)

Metástases ganglionares (n=34)				
Presentes	21 (61,8)	18 (62,1)	3 (60,0)	NS (0,93)
Metástases à distância (n=22)				
Presentes	9 (40,9)	8 (38,1)	1 (100,0)	NS (0,22)
Estádio (n=19)				
I	3 (15,8)	3 (16,7)	0	NS (0,81)
II	2 (10,5)	2 (11,1)	0	
III	4 (21,1)	4 (22,2)	0	
IV	10 (52,6)	9 (50,0)	1 (100)	
Estado clínico no final do seguimento (n=15)				
Persistência de doença	9 (60,0)	8 (57,1)	1 (100,0)	NS (0,40)
Mortalidade específica (n=23)	4 (17,4)	3 (30,0)	1 (7,7)	NS (0,18)*

*log-rank (Kaplan-Meier)

wt – *wild-type*, mut - mutação

Figura 14 - Curva de sobrevivência específica de Kaplan-Meier relativa ao grupo de doentes com carcinomas diferenciados com mutações no promotor do TERT, de acordo com o genótipo do NRAS



Discussão global

Nesta parte do trabalho pudemos confirmar o papel relevante de alguns fatores clínico-patológicos como indicadores de prognóstico (idade no momento do diagnóstico, gênero, tamanho do tumor, presença de invasão vascular e metástases à distância), contribuir para o esclarecimento da relevância clínica de algumas alterações genéticas conhecidas (mutações do *BRAF* e *NRAS*) e contribuir para o conhecimento de um novo mecanismo molecular subjacente à oncogênese dos carcinomas da tireoide com origem no epitélio folicular (mutações no promotor do *TERT*). Na sequência deste último resultado, foi ainda possível estabelecer a importância conferida pela presença de mutações no promotor do *TERT* na determinação do comportamento biológico dos tumores, consubstanciando esta alteração genética como um indicador de prognóstico independente nos doentes com carcinomas diferenciados da tireoide.

Fatores clínico-patológicos

A análise dos diferentes indicadores de prognóstico centrou-se nos doentes com carcinoma diferenciado da tireoide, uma vez que este grupo não só é largamente maioritário como representa o maior desafio na prática clínica. Entre os doentes com carcinoma diferenciado da tireoide, apenas 10-15% vêm a desenvolver doença persistente refratária ao tratamento, a qual pode acabar por ser letal. Por outro lado, o prognóstico conferido pelos histotipos «menos diferenciados» (carcinoma pouco diferenciado e carcinoma anaplásico) é desde logo mau, uma vez que se trata de tumores com comportamento clínico quase sempre agressivo. Este último aspeto levanta dúvidas quanto à utilidade de se insistir na procura de indicadores de prognóstico neste grupo.

No que diz respeito aos fatores clínicos, a idade no momento do diagnóstico constituiu um indicador de prognóstico relevante, tendo a idade mais avançada estado associada a mortalidade aumentada. O ponto de corte utilizado na análise – 45 anos – é aquele que demonstrou ter uma associação mais clara com o prognóstico dos doentes (162, 163), sendo reconhecido pela UICC/AJCC como um critério *major* no estadiamento dos doentes (250). Uma vez que o sistema de estadiamento da UICC/AJCC tem por base o risco de mortalidade específica pelo carcinoma, os resultados do nosso estudo estão em linha com este sistema, associando-se a idade superior a 45 anos a maior mortalidade específica. Verificou-se também uma tendência para os doentes mais velhos apresentarem mais frequentemente metástases à distância [OR =1,75 (0,91-3,37); p =0,09].

O gênero masculino esteve associado a maior frequência de metastização à distância e doença persistente no final do seguimento (em ambas de forma independente), não tendo ocorrido diferença significativa entre gêneros no que se refere à mortalidade específica. Estes resultados estão de acordo com os referidos em vários estudos, sendo geralmente reportada uma relação entre o gênero masculino e características clínico-patológicas agressivas, ao passo que a relação com a mortalidade (sobretudo como indicador independente) não tem sido sistematicamente reproduzida (168, 169). Salienta-se que o gênero masculino foi associado a estádios mais avançados na apresentação e a idade mais avançada no momento do diagnóstico. Para este facto também poderá contribuir a maior utilização de recursos de saúde por parte de mulheres jovens, permitindo o diagnóstico mais precoce de formas menos avançadas da doença (251). Apesar disto, não existe uma explicação consensual para este pior prognóstico no gênero masculino, estando a discussão deste assunto fora do âmbito do presente trabalho.

Relativamente aos fatores anátomo-patológicos, o tamanho do tumor e a presença de invasão vascular, de metástases ganglionares e de metástases à distância associaram-se a maior agressividade clínica. O maior tamanho do tumor associou-se a maior frequência de metástases à distância, embora não de uma forma independente. O tamanho do tumor é um critério utilizado pela UICC/AJCC no seu sistema de estadiamento, com dois pontos de corte: os 2 cm (separando as categorias T1 e T2) e os 4 cm (entre T2 e T3). Foram precisamente estes pontos de corte bem validados que utilizámos na análise de mortalidade, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre grupos. O mesmo se observou quando se compararam os doentes com tumores com dimensão ≤ 4 cm vs os doentes com tumores com mais de 4 cm (dados não mostrados nos resultados), sendo este ponto de corte o mais consensual em termos de aumento do risco de mortalidade (162). As relações encontradas no presente estudo entre o prognóstico dos doentes e os outros fatores considerados, assim como a associação entre o tamanho do tumor e a metastização à distância (esta aparentemente na dependência de outros fatores) poderão significar que o tamanho do tumor, quando comparado com outras características clínico-patológicas e moleculares, deve ser valorizado com precaução.

A presença de invasão vascular associou-se a maior frequência de metastização à distância nos doentes com carcinoma diferenciado. De facto, a invasão vascular revelou-se o único indicador independente de risco aumentado de metastização à distância, após ajuste para todos os outros fatores também a ela associados (género, tamanho do tumor e presença de mutações no promotor do *TERT*) (Tabela 29). Apesar da invasão vascular ser reconhecida como um importante critério para o diagnóstico de malignidade, existe controvérsia acerca do seu valor como indicador de prognóstico (191). Pensa-se que esta controvérsia é justificada pela ausência de consenso para a definição da presença de invasão vascular nos diferentes estudos. A frequência de metastização à distância nos doentes com carcinoma diferenciado da tiroide angioinvasivo no presente estudo (23,4%) ficou próxima da reportada numa série recente, na qual foram analisados mais de 4000 casos e foram aplicados critérios rigorosos para definir a presença de invasão vascular (192). No presente estudo foram utilizados critérios uniformes para a definição de invasão vascular e todos os casos foram revistos por um patologista especializado em doenças da tiroide, o que poderá ter contribuído para os resultados semelhantes ao da série referida (192), contribuindo para estabelecer a invasão vascular como um indicador de risco aumentado de metastização à distância. No que diz respeito à mortalidade específica, a análise da curva de Kaplan-Meier (Figura 6) parece indicar uma mortalidade ligeiramente aumentada nos doentes com tumores que apresentavam invasão vascular, mas a diferença observada não atingiu o limiar da significância estatística.

A existência de metástases ganglionares associou-se a maior frequência de doença persistente no final do seguimento, não estando associada à presença de metástases à distância ou a mortalidade aumentada. Estes dados estão de acordo com a literatura, uma vez que as metástases ganglionares, típicas do carcinoma papilar, têm sido associadas sobretudo a aumento do risco de recorrência loco-regional, parecendo ter reduzida influência na mortalidade dos doentes (apenas reportada em indivíduos com mais de 45 anos em algumas séries) (96, 252, 253). O nosso estudo reforça a ideia de que a presença de metástases ganglionares em doentes com carcinoma diferenciado da tiroide não afeta de forma significativa o prognóstico em termos de mortalidade, podendo no entanto ser um indicador de maior probabilidade de doença loco-regional persistente ou recorrente.

Os doentes com metástases à distância apresentaram mais frequentemente doença persistente no final do seguimento e mortalidade aumentada. As metástases à distância são reconhecidas em todos os sistemas de estadiamento como um dos principais indicadores de mau prognóstico (202-204, 250). Por esse motivo, para além da avaliação da importância prognóstica da existência de metástases à distância, procedemos também ao estudo dos fatores clínico-patológicos e moleculares que condicionam risco aumentado de ocorrência deste tipo de metastização.

Fatores moleculares

A frequência de mutações do *BRAF* encontrada no presente estudo (49,2% nos carcinomas papilares, 0% nos carcinomas foliculares, 10,3% nos carcinomas pouco diferenciados e 19,4% nos carcinomas anaplásicos) (Tabela 20) situou-se dentro do espectro dos resultados reportados em estudos prévios (17, 29).

No que diz respeito à relação entre a mutação do *BRAF* e as características clínico-patológicas, verificou-se que os doentes com tumores mutados para o *BRAF* eram significativamente mais velhos. A relação entre a presença da mutação do *BRAF* e a idade mais avançada dos doentes foi encontrada apenas em algumas séries (210, 212, 216, 254); uma revisão sistemática analisou a relação entre a presença da mutação e a idade no momento do diagnóstico, não tendo encontrado diferenças significativas entre os grupos com e sem a mutação (255). Sendo a idade um fator de prognóstico *major* nos doentes com carcinoma da tiroide, a existência de uma relação entre a mutação do *BRAF* e a idade mais avançada dos doentes poderia contribuir para explicar a associação encontrada em algumas séries entre a mutação do *BRAF* e um pior prognóstico dos doentes. No entanto, numa grande amostra obtida a partir de um estudo multicêntrico verificou-se que a presença da mutação se associou a pior prognóstico de uma forma independente da idade, perdendo-se o valor prognóstico da mutação do *BRAF* quando o risco foi ajustado para outros fatores clínico-patológicos, nomeadamente presença de extensão extratiroideia ou metástases ganglionares (217). No nosso estudo, não encontramos uma associação significativa entre a mutação do *BRAF* e qualquer das outras características clínico-patológicas associadas com um comportamento biológico mais agressivo dos tumores (género masculino, extensão extratiroideia, invasão vascular, metástases ganglionares, metástases à distância e estádios mais elevados na apresentação).

Os doentes com carcinomas papilares com mutação do *BRAF* foram submetidos a um número idêntico de terapêuticas com ¹³¹I, assim como a atividades cumulativas semelhantes, quando comparados com os doentes com tumores *BRAF* wt. Os dois grupos (*BRAF* wt e *BRAFV600E*) também foram submetidos a um número semelhante de outras modalidades terapêuticas. Este aspeto reveste-se de particular interesse, uma vez que foi descrita uma menor expressão do NIS – e em particular uma menor expressão do NIS membranar – nos carcinomas papilares com mutação do *BRAF* (219, 256), levantando a hipótese dos carcinomas papilares com esta mutação terem uma pior resposta à terapêutica com ¹³¹I. Os dados do presente trabalho não dão suporte a esta hipótese, justificando a necessidade de mais estudos que permitam esclarecer se efetivamente os tumores com mutação do *BRAF* apresentam uma menor expressão do NIS e, caso essa assunção se confirme, se essa menor expressão tem relevância na prática clínica.

Apesar dos doentes com tumores mutados para o *BRAF* terem apresentado com maior frequência doença persistente no final do seguimento (37,1% vs 22,7%), a diferença observada foi estatisticamente *borderline* ($p = 0,05$). Estes resultados são difíceis de interpretar e valorizar, sendo possível que o aumento da dimensão da amostra pudesse vir a esclarecer até que ponto a mutação do *BRAF* tem ou não, *per se*, significado preditivo para doença persistente em doentes com carcinoma papilar. Os dados disponíveis a este propósito são controversos: alguns estudos não encontraram uma associação entre a presença da mutação e a persistência ou recorrência da doença (189, 210), enquanto duas meta-análises concluíram que os doentes com tumores mutados têm um risco maior de persistência ou recorrência (209, 257). De referir que nenhum destes trabalhos demonstrou que esta associação era independente de outros fatores clínico-patológicos. Serão necessários mais estudos para esclarecer este assunto, o qual também está estreitamente ligado com a resposta ao tratamento.

A mortalidade específica pelo carcinoma tiroideu relaciona-se, como é óbvio, com a resposta ao tratamento. No presente estudo não observámos uma associação entre a mutação do *BRAF* e a mortalidade específica. É de salientar que se torna difícil demonstrar uma associação de qualquer fator com mortalidade específica nos doentes com carcinoma diferenciado da tiroide, em particular nos doentes com carcinoma papilar, fruto das elevadas taxas de sobrevivência, que chegam aos 95-98% aos 10 anos (29). Um estudo multicêntrico demonstrou que a presença da mutação se associou a mortalidade aumentada, mas não de uma forma independente de outros fatores como a extensão extratiroideia ou a presença de metástases ganglionares (217).

Uma vez que é possível determinar o genótipo tumoral do *BRAF* em amostras de citologia (84, 85), alguns autores propuseram que a presença da mutação do *BRAF* pudesse contribuir para guiar a atitude terapêutica subsequente (221). Partindo do pressuposto de que a mutação se associaria a um comportamento biológico mais agressivo dos tumores, em particular maior frequência de metástases ganglionares e recorrência loco-regional, assim como a uma pior resposta ao ^{131}I , propuseram-se abordagens terapêuticas iniciais mais agressivas (tiroidectomias mais extensas com esvaziamento profilático do compartimento central, menor limiar para a realização de terapêutica ablativa com ^{131}I e utilização de doses mais elevadas na mesma). Neste contexto, alguns estudos abordaram especificamente o interesse do estudo molecular da mutação do *BRAF* como fator determinante da extensão da cirurgia, nomeadamente a realização ou não de esvaziamento ganglionar profilático (258-261). Na maioria dos estudos, a adoção de uma atitude terapêutica mais agressiva condicionada pela presença da mutação do *BRAF* não alterou a frequência de metástases ganglionares encontrada nem os resultados obtidos no seguimento dos doentes. Apesar deste assunto não ter sido abordado especificamente no nosso trabalho, a falta de associação com a metastização ganglionar, com a resposta ao tratamento e com o prognóstico que observámos em relação à presença de tumores mutados para o *BRAF* reforça a prematuridade de condicionar a abordagem terapêutica inicial ao genótipo tumoral do *BRAF* *per se*. (Esta discussão é desenvolvida com maior profundidade na referência (262), correspondente ao artigo V do presente trabalho.)

Em resumo, os resultados do presente estudo não parecem indicar que as mutações do *BRAF* sejam, pelo menos isoladamente, um indicador de prognóstico relevante nos doentes com carcinoma papilar da tiroide.

As frequências da mutação do *NRAS* nos carcinomas diferenciados observadas no presente estudo (5,0% no carcinoma papilar, correspondendo a 2,3% na forma clássica e 13,2% na variante folicular; 21,9% no carcinoma folicular) (Tabela 23) encontram-se no limiar inferior do espectro reportado noutras séries, em particular no carcinoma papilar (29, 263). O principal fator responsável pela variação da frequência relativa das mutações do *NRAS* nos carcinomas papilares parece ser a proporção entre a forma clássica e a variante folicular incluída nas diferentes séries. Sabendo-se que as mutações da *NRAS* são sobretudo encontradas na variante folicular do carcinoma papilar, é natural que as séries que incluam uma proporção maior de casos representativos dessa variante reportem uma frequência mais elevada de mutações do *NRAS*.

Uma vez que o nosso estudo pretendeu sobretudo analisar o impacto de fatores clínico-patológicos e moleculares como indicadores de prognóstico em doentes com carcinoma diferenciado da tiroide, optámos por constituir um grupo específico para analisar o papel das mutações do *NRAS* como indicador de prognóstico: os carcinomas diferenciados nos quais a mutação do *NRAS* é frequente (variante folicular do carcinoma papilar e carcinoma folicular). Pretendemos assim evitar que a análise do grupo de doentes com carcinoma diferenciado fosse enviesada pelo elevado número de formas clássicas do carcinoma papilar (cerca de 75% do total), nas quais esta mutação é muito pouco frequente (2,3% na presente série).

Não observámos uma associação significativa entre a mutação do *NRAS* e qualquer das características clínico-patológicas estudadas (idade, género, tamanho do tumor, extensão extratiroideia, invasão vascular, metástases ganglionares, metástases à distância, estágio na apresentação), quer no grupo de doentes com carcinoma diferenciado anteriormente definido, quer nos subgrupos constituídos por doentes com variante folicular do carcinoma papilar ou com carcinoma folicular, quer ainda no grupo de doentes com carcinomas «menos diferenciados» (Tabela 24). No grupo de doentes com carcinomas diferenciados, a mutação do *NRAS* não se associou a pior resposta ao tratamento nem a persistência de doença no final do seguimento, nem ainda a mortalidade específica aumentada. Apesar de existirem alguns estudos que observaram uma associação entre a mutação do *NRAS* e pior prognóstico em doentes com carcinoma diferenciado da tiroide (225, 264), não existem para já dados suficientes que permitam considerar esta alteração genética como um indicador de prognóstico nesse grupo de doentes (263).

Em termos de tratamento dos carcinomas da tiroide metastáticos refratários ao ^{131}I , uma perspetiva diferente foi abordada recentemente numa pequena série de doentes. Utilizou-se um inibidor da MEK (selumetinib) para promover a rediferenciação de lesões metastáticas que não captavam iodo. A utilização deste fármaco permitiu aumentar a captação de ^{131}I em quantidade suficiente para justificar a administração de uma terapêutica, tendo-se observado benefícios clínicos. O grupo de doentes que melhor respondeu ao tratamento com selumetinib foi o grupo com tumores mutados para o *RAS*. Caso estes dados se confirmem em séries maiores, esta alteração molecular poderá vir a ser utilizada como fator preditivo de resposta ao tratamento rediferenciador com este fármaco.

Em resumo, os resultados do presente estudo não parecem indicar que as mutações do *NRAS* tenham utilidade como indicador de prognóstico nos doentes com carcinoma diferenciado da tiroide.

A pesquisa de mutações no promotor do *TERT* numa série de lesões benignas e malignas da tiroide revelou a sua presença apenas em carcinomas da tiroide derivados do epitélio folicular. A localização destas mutações no promotor e não na região codificante do gene, levando dessa forma à criação de novos locais de ligação para fatores de transcrição, representa um mecanismo inovador de ativação génica no cancro. O significado oncobiológico da mutação no promotor do *TERT* é sustentado pela associação significativa com a expressão do mRNA da *TERT*: maior expressão nos carcinomas com mutação quando comparados com os *wild-type* (Figura 10).

A ausência da mutação no promotor do *TERT* em tecido tiroideu normal, em lesões benignas (tiroidites, adenomas, bócios multinodulares) e nos carcinomas medulares (Tabela 26) está de acordo com séries previamente publicadas (265, 266). Também não encontramos mutações no promotor do *TERT* em nenhum dos carcinomas com características oncocíticas. Se no caso da variante oncocítica do carcinoma papilar esse facto pode ser explicado pela reduzida dimensão da amostra (n=9), o mesmo já não é verdade em relação aos carcinomas foliculares oncocíticos (n=27), no qual não foi encontrada qualquer mutação no promotor do *TERT*, em comparação com a sua presença em 12 de 43 carcinomas foliculares não oncocíticos (27,9%). Apesar do nosso estudo não fornecer uma explicação para estes resultados, eles permitem reforçar a ideia de que os tumores oncocíticos da tiroide apresentam alterações genéticas e metabólicas próprias (26, 267, 268). Também não encontramos mutações no promotor do *TERT* num grupo de tumores benignos e malignos de doentes irradiados após o acidente nuclear de Chernobyl, sugerindo que a irradiação não é um fator etiológico importante na ocorrência destas mutações.

As mutações no promotor do *TERT* foram encontradas em 12,4% dos carcinomas derivados do epitélio folicular, tendo sido encontradas em 7,5% dos carcinomas papilares, 17,1% dos carcinomas foliculares, 29,0% dos carcinomas pouco diferenciados e 33,3% dos anaplásicos (Tabela 27). Esta distribuição pelos diferentes histotipos é semelhante à recentemente publicada por Liu X *et al* (265) e inferior à reportada por outros dois estudos (266, 269). O número relativamente baixo de microcarcinomas (10,0%; Tabela 17), todos sem mutação no promotor do *TERT*, e a elevada percentagem de metástases à distância (15,0% nos carcinomas diferenciados) quando comparados com algumas séries recentemente publicadas (1, 11, 270), sugere a possibilidade da amostra incluída no presente estudo dizer respeito a doentes com estádios mais avançados referenciados a centros académicos. Serão necessários mais estudos que incluam doentes de risco baixo para estabelecer de uma forma mais precisa a frequência das mutações no promotor do *TERT* nos diferentes histotipos.

Nos carcinomas diferenciados, a presença de mutações no promotor do *TERT* associou-se a uma idade mais avançada no momento do diagnóstico, maior tamanho do tumor, maior frequência de metástases à distância e estágio mais avançado. Estes resultados estão de acordo com os dados previamente publicados, nos quais as mutações no promotor do *TERT* foram encontradas com maior frequência nas categorias histológicas classicamente associadas com um

comportamento clínico mais agressivo (265, 266). O principal contributo adicional do nosso estudo foi demonstrar que os doentes com tumores que apresentavam mutações no promotor do *TERT* tinham uma mortalidade aumentada quando comparados com os doentes cujos tumores eram *wild-type* para o promotor do *TERT*, sendo esta conclusão verdadeira quer se considerasse a totalidade dos doentes com carcinoma diferenciado, quer se considerassem os subgrupos com carcinomas papilares ou foliculares de uma forma independente. A utilidade das mutações no promotor do *TERT* nos carcinomas diferenciados é particularmente relevante pelos dois fatores anteriormente mencionados: apenas uma pequena percentagem destes carcinomas tem um comportamento clínico agressivo, eventualmente letal e, por outro lado, há falta de bons indicadores de prognóstico para os doentes com carcinoma diferenciado da tiroide.

As mutações no promotor do *TERT* foram mais prevalentes nos carcinomas pouco diferenciados (29,0%) e nos carcinomas anaplásicos (33,3%) em comparação com os carcinomas diferenciados. Apesar de não ter sido encontrada uma relação entre as mutações no promotor do *TERT* e a mortalidade neste grupo de tumores «menos diferenciados» (dados não descritos no capítulo «Resultados»), o prognóstico sombrio da grande maioria dos doentes com carcinomas pouco diferenciados ou anaplásicos e as características clínico-patológicas agressivas destes tumores levantam dúvidas acerca da utilidade de procurar indicadores moleculares de prognóstico, como as mutações no promotor do *TERT*, na prática clínica. Para além disso, o número relativamente pequeno de doentes incluído nestas duas categorias não permite tirar conclusões definitivas relativamente ao valor prognóstico desta alteração molecular. Ainda no que diz respeito à análise da mortalidade específica pela doença, o número de doentes e de eventos ocorridos na categoria carcinoma folicular não foi suficiente para permitir uma análise de regressão de Cox multivariada. Foi possível estabelecer a associação da presença de mutações no promotor do *TERT* com mortalidade aumentada no grupo de doentes com carcinoma folicular, mas não pudemos demonstrar que essa associação era independente de fatores como a idade e o género, tal como sucedeu com os carcinomas papilares. Este assunto deverá ser esclarecido em séries maiores com um seguimento mais prolongado.

Apesar do prognóstico global dos doentes com carcinoma diferenciado da tiroide ser bom, a situação é diferente nos doentes mais velhos com metástases à distância, os quais apresentam uma sobrevivência aos 5 anos de 30-40% (271). Devido à relevância clínica da presença de metástases à distância e uma vez que as mutações no promotor do *TERT* se associavam significativamente a estas lesões secundárias, procedemos a uma regressão logística multivariada na qual foram incluídos os fatores clínico-patológicos e moleculares associados à metastização à distância. A presença de mutações no promotor do *TERT* foi um fator preditivo independente depois de se ajustar para o género, para o tamanho do tumor ou para a invasão vascular de uma forma isolada. A presença da mutação também foi um fator preditivo independente para metastização à distância quando se ajustou o OR para os conjuntos invasão vascular e género ou género e tamanho do tumor. Quando todos os fatores associados com a metastização à distância foram incluídos no modelo multivariado (género, tamanho do tumor, invasão vascular e mutações no promotor do *TERT*), a invasão vascular tornou-se no único fator preditivo independente. Do ponto de vista clínico, a presença de invasão vascular é uma característica apenas acessível depois da cirurgia e todas as outras – género, tamanho do tumor (estimado por ecografia) e mutações no promotor do *TERT* (caso seja possível realizar o estudo

em amostras de citologia) – podem no futuro próximo estar acessíveis aos clínicos previamente à cirurgia, permitindo uma melhor estratificação do risco antes da primeira abordagem terapêutica. Por este motivo, optámos por apresentar os resultados do modelo multivariado com e sem o contributo da invasão vascular (Tabela 29).

A associação da presença de mutações no promotor do *TERT* com maior mortalidade específica nos doentes com carcinoma diferenciado foi independente da idade e do género. Para além das mutações no promotor do *TERT* e da existência de metástases à distância, a idade no momento do diagnóstico foi o único fator significativamente associado com menor sobrevivência neste estudo. Apesar da relevância das metástases à distância na previsão da evolução dos doentes, trata-se, mais uma vez, de uma informação que só se adquire no decurso do seguimento dos doentes em mais de metade dos casos (272). Apesar de não termos observado uma associação entre a mortalidade e o género optámos, face à relevância que este fator pode ter na determinação do prognóstico (anteriormente discutido), por ajustar o HR para a idade e para o género. A associação da presença de mutações no promotor do *TERT* com mortalidade aumentada dos doentes manteve-se quer se fizesse o ajustamento do HR apenas para a idade (não referido no capítulo «Resultados») ou para a idade e para o género (Tabela 32).

Recentemente foi publicado um trabalho por Liu T *et al* que descreve a frequência das mutações no promotor do *TERT* numa série de 107 carcinomas de diferenciação folicular (51 carcinomas papilares, 36 foliculares e 20 anaplásicos) e a sua relação com a idade dos doentes e a existência de telómeros mais curtos (269). Os autores propõem que a existência de telómeros mais curtos no início do processo oncogénico em indivíduos mais idosos promova, através do encurtamento que ocorre em divisões celulares sucessivas, o atingimento rápido de um limiar crítico que desencadeia um fenómeno de crise telomérica, facilitando a aquisição de novas alterações genéticas, as quais incluem as mutações no promotor do *TERT*. Foi também encontrada uma relação entre a presença de mutações no promotor do *TERT* e a metastização à distância, assim como com um aumento da mortalidade na série completa e no subgrupo de doentes com carcinoma papilar. Estes resultados estão de uma forma geral de acordo com os observados no nosso estudo. No entanto, deve ser salientado que os resultados de Liu T *et al* foram obtidos numa coorte de carcinomas diferenciados extremamente agressivos (51 doentes com carcinoma papilar e 36 com carcinoma folicular, com uma mortalidade específica pela doença de 24,1%), enquanto a mortalidade específica pela doença no nosso estudo, em carcinomas diferenciados, é apenas de 2,2%, o que aliás está de acordo com a descrita nas grandes séries publicadas nos últimos anos (9, 217). A maior dimensão da amostra do presente estudo permitiu ainda uma análise de regressão, através da qual podemos demonstrar que a associação das mutações no promotor do *TERT* com mortalidade específica aumentada era independente da idade e do género dos doentes. Considerando os resultados dos dois trabalhos em conjunto, pode concluir-se que, embora incluindo populações muito diferentes, ambos indicam que as mutações no promotor do *TERT* em carcinomas diferenciados constituem um marcador de doença agressiva e de mau prognóstico.

Os doentes com carcinoma diferenciado que apresentavam mutações no promotor do *TERT* e se encontravam livres de doença no final do seguimento eram percentualmente em menor número do que os doentes com tumores *wild-type*, tendo sido sujeitos a um número significativamente superior de tratamentos com ¹³¹I, com doses cumulativas mais elevadas,

assim como a um maior número de outras modalidades terapêuticas. Combinando estes dados com a mortalidade específica aumentada, é provável que no futuro o genótipo do promotor do *TERT* seja considerado para individualizar as decisões terapêuticas, nomeadamente o tipo de cirurgia (se a análise molecular for exequível em amostras de citologia), a decisão para realizar ou não terapêutica ablativa e a atividade de ^{131}I a administrar aos doentes. O último aspeto é particularmente pertinente, uma vez que a tendência atual é para reduzir o número de doentes submetidos a terapêutica ablativa e utilizar doses baixas (111, 112, 273). Os futuros consensos internacionais e *guidelines* também poderão incluir o genótipo do promotor do *TERT* para estabelecer a melhor estratégia personalizada de seguimento.

Quer o DNA quer o RNA do *TERT* foram já utilizados para induzir respostas imunológicas de células *T-helper* e linfócitos T citotóxicos contra tumores com expressão aumentada da *TERT* (274, 275). Neste contexto, uma possibilidade interessante a explorar no futuro será a utilização de imunoterapias baseadas na *TERT* especificamente nos doentes com carcinomas com mutação no promotor génico, uma vez que estes tumores têm maior expressão da *TERT* e apresentam um prognóstico mais sombrio, provavelmente devido a estarem associados a uma pior resposta às terapêuticas atualmente disponíveis. Sendo atraente sob o ponto de vista clínico, esta estratégia carece ainda de dados que a sustentem de uma forma consistente.

No presente estudo, as mutações no promotor do *TERT* estiveram associadas com mutações do *BRAF*, reforçando a coexistência de ativação dos genes *TERT* e *BRAF*, a qual já tinha sido previamente descrita em melanomas (51). Horn *et al* (51) postula que a mutação no promotor do *TERT* cria novos locais de ligação para fatores de transcrição da família *TCF* (Elk 1 e Elk 4), os quais podem ser ativados pelo *BRAF*. Quer em melanomas quer em carcinomas da tiroide parece que uma ativação do *BRAF* aumenta o efeito das mutações no promotor do *TERT*. Os resultados do nosso estudo relativos à expressão do mRNA do *TERT* parecem corroborar esta hipótese, uma vez que o grupo de tumores que mostrou maior expressão foi aquele em que coexistiam as duas mutações (Figura 11). No entanto, a existência em simultâneo das mutações no promotor do *TERT* e no *BRAF* não se associaram a maior agressividade clínica ou a pior prognóstico dos doentes, quando comparadas com a presença apenas das mutações no promotor do *TERT* (Figura 13 e Tabela 33). Ressalva-se que estes resultados deverão ser interpretados com precaução, em virtude do número reduzido de doentes incluídos em cada um dos grupos.

As mutações no promotor do *TERT* associaram-se a maior frequência de metastização à distância. O significado biológico desta associação permanece por esclarecer. Sendo uma das propriedades fundamentais das células neoplásicas e permitindo a sua imortalidade replicativa, a ativação da *TERT* parece ser independente do microambiente tumoral, uma vez que não há evidência de que o estroma contribua para a estabilidade telomérica das células neoplásicas (276). Os nossos resultados sugerem que pode existir uma ligação entre a ativação da telomerase e a capacidade metastática. É possível especular que essa ligação tenha por base uma maior resistência das células com mutação no promotor do *TERT* durante a fase de circulação ou de alojamento noutros órgãos ou tecidos e não no aumento das propriedades invasoras das células com mutação, mas a discussão destes aspetos ultrapassa o âmbito do presente trabalho.

Em resumo, as mutações no promotor do *TERT* revelaram-se um indicador de maior agressividade clínica dos carcinomas da tireoide de diferenciação folicular, estando associadas à metastização à distância, pior resposta ao tratamento e aumento da mortalidade específica pela doença.

5. – Conclusões

O presente trabalho teve como principal força motivadora a dificuldade, sentida na prática clínica da consulta de Oncologia da Tireoide, em estabelecer uma boa avaliação do prognóstico dos doentes com carcinoma da tireoide de diferenciação folicular. Pretendemos otimizar os dados clínicos e bioquímicos disponíveis e contribuir para o esclarecimento da utilidade na prática clínica de algumas alterações moleculares frequentes nestes carcinomas. Pretendemos também aprofundar os conhecimentos relativos à oncobiologia destes tumores, através da pesquisa de uma nova alteração molecular, a mutação no promotor do gene *TERT*, estudando subsequentemente a sua utilidade prognóstica.

Foi com base nestes objetivos gerais que concebemos os objetivos específicos. Por um lado, no estudo clínico-patológico e bioquímico, quisemos avaliar o valor preditivo da tiroglobulina no momento da ablação estimulada com rhTSH para ausência de doença um ano depois. Trata-se de um doseamento simples e económico, cujo valor prognóstico ainda não havia sido demonstrado neste contexto. No que diz respeito ao estudo clínico-patológico e molecular, propusemo-nos contribuir para o esclarecimento do valor prognóstico das mutações do *BRAF* e *NRAS* numa coorte de doentes com carcinoma diferenciado da tireoide, avaliando especificamente o valor preditivo para metastização à distância, resposta à terapêutica, persistência de doença no final do seguimento e mortalidade específica pela doença. Numa segunda fase, estudámos a frequência das mutações no promotor do *TERT* numa grande série de lesões benignas e malignas da tireoide e avaliámos o valor prognóstico da presença destas alterações moleculares.

No que diz respeito ao estudo clínico-patológico e bioquímico e ao primeiro objetivo específico, os níveis séricos estimulados da tiroglobulina no momento da ablação sob rhTSH apresentaram um valor preditivo independente para ausência de doença num ponto crucial do seguimento dos doentes com carcinoma diferenciado da tireoide: a avaliação um ano depois da abordagem terapêutica inicial. Concluímos que um valor de tiroglobulina inferior a 7,2 ng/dL pode ser considerado um fator de prognóstico favorável.

Relativamente ao estudo clínico-patológico e molecular e ao segundo objetivo específico, a presença da mutação do *BRAF*, característica dos carcinomas papilares da tireoide, associou-se com a idade mais avançada dos doentes no momento do diagnóstico. Não encontramos nenhuma associação com outras características clínico-patológicas sugestivas de comportamento agressivo, nem com pior resposta ao tratamento. Em consonância, a percentagem de doentes com persistência de doença no final do seguimento não foi significativamente diferente quando foram comparados os grupos que tinham tumores com e sem mutação do *BRAF*. A mutação *BRAF V600E* também não se associou a maior mortalidade específica pela doença. Estes dados sugerem que as mutações do *BRAF* não são, pelo menos *per se*, um indicador de prognóstico relevante nos doentes com carcinoma papilar da tireoide.

As mutações do *NRAS* não se associaram a nenhuma característica clínico-patológica sugestiva de comportamento agressivo. A resposta ao tratamento, percentagem de doentes com doença

persistente no final do seguimento e mortalidade específica pela doença foram semelhantes quando se compararam os grupos de doentes com carcinomas com e sem mutação do *NRAS*. As mutações do *NRAS* não parecem ter valor prognóstico em doentes com carcinoma diferenciado da tiroide.

No que diz respeito ao terceiro objetivo específico, não encontramos mutações no promotor do *TERT* em tecido tiroideu normal, lesões benignas ou carcinomas medulares, estando a sua presença restrita aos carcinomas da tiroide de diferenciação folicular. Nestes últimos, existe um aumento progressivo da sua frequência entre as formas diferenciadas e as formas «menos diferenciadas» (carcinoma pouco diferenciado e anaplásico).

Nos carcinomas diferenciados, as mutações no promotor do *TERT* associaram-se significativamente com a idade mais avançada dos doentes no momento do diagnóstico, maior tamanho do tumor, metastização à distância e estádios mais avançados. Os doentes com carcinoma diferenciado com mutação no promotor do *TERT* apresentaram uma pior resposta ao tratamento. A presença de mutações no promotor do *TERT* foi um fator preditivo independente de doença persistente no final do seguimento.

A presença de mutações no promotor do *TERT* constituiu também um fator preditivo independente de maior mortalidade específica pela doença. Este facto, em combinação com os anteriores, permite concluir que as mutações no promotor do *TERT* são um indicador *major* de prognóstico em doentes com carcinoma diferenciado da tiroide.

Globalmente, concluímos que os nossos estudos identificaram dois indicadores relevantes de prognóstico: o valor estimulado da tiroglobulina no momento da ablação com ¹³¹I sob a ação da rhTSH e as mutações no promotor do *TERT*. O primeiro passou já a ser utilizado na prática clínica para antever a necessidade de um seguimento mais apertado, com eventual benefício de intervenções terapêuticas adicionais para além da inicial. O segundo poderá passar a ser utilizado na prática clínica no futuro próximo, numa primeira fase contribuindo para selecionar a terapêutica a implementar em doentes com carcinoma diferenciado portador da mutação, favorecendo a opção por realizar terapêutica ablativa nestes doentes, na qual se preconizará a utilização de atividades mais elevadas de ¹³¹I. A opção por atividades mais elevadas também poderá ser recomendada em tratamentos subsequentes. A informação sobre a presença da mutação poderá também promover uma pesquisa mais ativa de eventuais localizações secundárias no seguimento dos doentes. Caso se comprove que a pesquisa de mutações no promotor do *TERT* pode ser realizada em amostras de citologia, a presença da mutação poderá servir não apenas para afirmar a malignidade do nódulo nos casos em que o resultado da citologia é indeterminado, como também para selecionar a cirurgia inicial, favorecendo a realização de tireoidectomia total se o contexto clínico for apropriado.

6. – Perspetivas futuras

Face aos resultados encontrados neste trabalho e às questões científicas que eles levantam, algumas linhas de investigação no futuro próximo poderão ser úteis para ajudar a aumentar o conhecimento científico nesta área. De entre estas, salientaria:

- Avaliar a frequência de mutações no promotor do *TERT* numa série maior de carcinomas com características oncocíticas, sobretudo do histotipo papilar, para confirmação dos dados do presente estudo relativos à baixa frequência destas mutações neste grupo de tumores.
- Aumentar o número de doentes com carcinoma folicular da tiroide e com seguimento prolongado a incluir numa amostra futura onde seja possível realizar o estudo molecular do promotor do *TERT* nos tumores. Este trabalho poderá esclarecer se o fator preditivo para mortalidade aumentada das mutações no promotor do *TERT* neste grupo histológico também é, como no carcinoma papilar, independente da idade no momento do diagnóstico e do género dos doentes.
- Uma vez que observámos uma associação significativa entre as mutações no promotor do *TERT* e a metastização à distância, avaliar a frequência da mutação em tecido metastático, assim como a concordância com o estado mutacional do tumor primitivo. Este estudo poderá ajudar a compreender a relação entre estas mutações e o processo da metastização à distância.
- Os tumores com mutação no promotor do *TERT* apresentaram pior resposta ao tratamento com ¹³¹I. Uma vez que a expressão do NIS é essencial para a entrada do iodo na célula folicular da tiroide, terá interesse avaliar se os tumores com mutação no promotor do *TERT* apresentam menor expressão do NIS e/ou menor localização membranar, o que contribuiria para justificar a pior resposta ao tratamento observada do ponto de vista clínico.

7. – Bibliografia

1. **Davies L, Welch HG** 2006 Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 295:2164-2167
2. **Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R** 2013 Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *Journal of cancer epidemiology* 2013:965212
3. **Ito Y, Nikiforov YE, Schlumberger M, Vigneri R** 2013 Increasing incidence of thyroid cancer: controversies explored. *Nature reviews. Endocrinology* 9:178-184
4. **DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C** 2004 WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon: IARC Press
5. **Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR** 1998 A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see commetns]. *Cancer* 83:2638-2648
6. **Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM** 2009 Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19:1167-1214
7. **Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W** 2006 European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 154:787-803
8. **Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Pentheroudakis G** 2010 Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5:v214-219
9. **Hayat MJ, Howlander N, Reichman ME, Edwards BK** 2007 Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 12:20-37
10. **Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR** 1997 Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer* 79:564-573
11. **Elisei R, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Masserini L, Ceccarelli C, Lippi F, Grasso L, Basolo F, Bevilacqua G, Miccoli P, Di Coscio G, Vitti P, Pacini F, Pinchera A** 2010 Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1516-1527
12. **Goffredo P, Sosa JA, Roman SA** 2013 Differentiated thyroid cancer presenting with distant metastases: a population analysis over two decades. *World journal of surgery* 37:1599-1605
13. **Katoh R, Sasaki J, Kurihara H, Suzuki K, Iida Y, Kawaoi A** 1992 Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. *Cancer* 70:1585-1590
14. **Grebe SK, Hay ID** 1996 Thyroid cancer nodal metastases: biologic significance and therapeutic considerations. *Surgical oncology clinics of North America* 5:43-63
15. **Haugen BR, Sherman SI** 2013 Evolving approaches to patients with advanced differentiated thyroid cancer. *Endocr Rev* 34:439-455
16. **Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Maximo V, Sobrinho-Simoes M** 2007 Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 51:643-653

17. **Xing M** 2013 Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature reviews. Cancer* 13:184-199
18. **Alevizaki M, Papageorgiou G, Rentziou G, Saltiki K, Marafelia P, Loukari E, Koutras DA, Dimopoulos MA** 2009 Increasing prevalence of papillary thyroid carcinoma in recent years in Greece: the majority are incidental. *Thyroid* 19:749-754
19. **Williams ED, Doniach I, Bjarnason O, Michie W** 1977 Thyroid cancer in an iodide rich area: a histopathological study. *Cancer* 39:215-222
20. **Sobrinho-Simoes M, Eloy C, Magalhaes J, Lobo C, Amaro T** 2011 Follicular thyroid carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24 Suppl 2:S10-18
21. **Williams ED** 2000 Guest Editorial: Two Proposals Regarding the Terminology of Thyroid Tumors. *International journal of surgical pathology* 8:181-183
22. **Soares P, Lima J, Preto A, Castro P, Vinagre J, Celestino R, Couto JP, Prazeres H, Eloy C, Maximo V, Sobrinho-Simoes M** 2011 Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Current genomics* 12:609-617
23. **Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R, Lloyd RV, LiVolsi VA, Papotti M, Sobrinho-Simoes M, Bussolati G, Rosai J** 2007 Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *The American journal of surgical pathology* 31:1256-1264
24. **Ibrahimasic T, Ghossein R, Carlson DL, Nixon I, Palmer FL, Shaha AR, Patel SG, Tuttle RM, Shah JP, Ganly I** 2014 Outcomes in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 99:1245-1252
25. **Maximo V, Rios E, Sobrinho-Simoes M** 2014 Oncocytic lesions of the thyroid, kidney, salivary glands, adrenal cortex, and parathyroid glands. *International journal of surgical pathology* 22:33-36
26. **Maximo V, Lima J, Prazeres H, Soares P, Sobrinho-Simoes M** 2012 The biology and the genetics of Hurthle cell tumors of the thyroid. *Endocrine-related cancer* 19:R131-147
27. **Neff RL, Farrar WB, Kloos RT, Burman KD** 2008 Anaplastic thyroid cancer. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 37:525-538, xi
28. **Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, Bible KC, Brierley JD, Burman KD, Kebebew E, Lee NY, Nikiforov YE, Rosenthal MS, Shah MH, Shaha AR, Tuttle RM, American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines T** 2012 American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid* 22:1104-1139
29. **Nikiforov YE, Nikiforova MN** 2011 Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature reviews. Endocrinology* 7:569-580
30. **Pontes L SM, Matos F** 2013 RORENO. Registo Oncológico Nacional 2007. In: EPE IPdOdPFG- ed. Porto
31. **Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A** 2014 Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 64:9-29
32. **Roti E, Rossi R, Trasforini G, Bertelli F, Ambrosio MR, Busutti L, Pearce EN, Braverman LE, Degli Uberti EC** 2006 Clinical and histological characteristics of papillary thyroid microcarcinoma: results of a retrospective study in 243 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2171-2178
33. **Morris LG, Sikora AG, Tosteson TD, Davies L** 2013 The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid* 23:885-891
34. **Davies L, Welch HG** 2014 Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery* 140:317-322
35. **Harach HR, Franssila KO, Wasenius VM** 1985 Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study. *Cancer* 56:531-538

36. **Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, Tomoda C, Takamura Y, Kobayashi K, Miya A** 2010 An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World journal of surgery* 34:28-35
37. **Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, Higashiyama T, Kobayashi K, Miya A** 2014 Patient age is significantly related to the progression of papillary microcarcinoma of the thyroid under observation. *Thyroid* 24:27-34
38. **Soares P, Celestino R, Gaspar da Rocha A, Sobrinho-Simoes M** 2014 Papillary thyroid microcarcinoma: how to diagnose and manage this epidemic? *International journal of surgical pathology* 22:113-119
39. **Sprague BL, Warren Andersen S, Trentham-Dietz A** 2008 Thyroid cancer incidence and socioeconomic indicators of health care access. *Cancer causes & control : CCC* 19:585-593
40. **Pontes L SM, Luz R** 2008 Registo Oncológico Nacional 2001. In: Gentil IPdOF ed. Porto
41. SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program) Stat Facts Sheet 1975-2011. In: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ld/thyro.html>, acesso a 16/05/2014
42. **MacCorkle R, Tan T-H** 2005 Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys* 43:451-461
43. **Brzezianska E, Pastuszak-Lewandoska D** 2011 A minireview: the role of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways in thyroid follicular cell-derived neoplasm. *Frontiers in bioscience* 16:422-439
44. **Hou P, Liu D, Xing M** 2011 Genome-wide alterations in gene methylation by the BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer cells. *Endocrine-related cancer* 18:687-697
45. **Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M** 2003 BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578-4580
46. **Garcia Z, Kumar A, Marques M, Cortes I, Carrera AC** 2006 Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *The EMBO journal* 25:655-661
47. **Xing M** 2010 Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 20:697-706
48. **Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, Ghossein RA, Fagin JA** 2009 Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer research* 69:4885-4893
49. **Hanahan D, Weinberg RA** 2011 Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
50. **Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L** 2013 Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nature reviews. Genetics* 14:703-718
51. **Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R** 2013 TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339:959-961
52. **Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA** 2013 Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 339:957-959
53. **Xing M** 2007 BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 28:742-762
54. **Charles RP, Iezza G, Amendola E, Dankort D, McMahon M** 2011 Mutationally activated BRAF(V600E) elicits papillary thyroid cancer in the adult mouse. *Cancer research* 71:3863-3871
55. **Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, Fugazzola L, Budillon A, Moccia T, Fenzi G, Vitale M** 2012 The primary occurrence of BRAF(V600E) is a rare clonal event in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 97:517-524

56. **Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE** 2013 Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E1852-1860
57. **Sobrinho-Simoes M, Eloy C, Vinagre J, Soares P** 2010 Molecular pathology of thyroid tumors: diagnostic and prognostic relevance. *International journal of surgical pathology* 18:209S-212S
58. **Eloy C, Santos J, Soares P, Sobrinho-Simoes M** 2011 The preeminence of growth pattern and invasiveness and the limited influence of BRAF and RAS mutations in the occurrence of papillary thyroid carcinoma lymph node metastases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 459:265-276
59. **Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, Barbi F, Avenia N, Scipioni A, Verrienti A, Tosi E, Cavaliere A, Gulino A, Filetti S, Russo D** 2007 BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2840-2843
60. **Riesco-Eizaguirre G, Rodriguez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, Santisteban P** 2009 The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer research* 69:8317-8325
61. **Miller KA, Yeager N, Baker K, Liao XH, Refetoff S, Di Cristofano A** 2009 Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer research* 69:3689-3694
62. **Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A, Salvatore D, Zhang L, Manzo G, Picone A, Portella G, Santelli G, Vecchio G, Fusco A** 1996 Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene* 12:1821-1826
63. **Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D, Sobrinho-Simoes M** 2004 BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4267-4271
64. **Fusco A, Santoro M** 2007 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 51:731-735
65. **Gregory Powell J, Wang X, Allard BL, Sahin M, Wang XL, Hay ID, Hiddinga HJ, Deshpande SS, Kroll TG, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B** 2004 The PAX8/PPARGamma fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARGamma inhibition. *Oncogene* 23:3634-3641
66. **Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simoes M** 2006 PAX8-PPARGamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91:213-220
67. **Liu D, Yang C, Bojdani E, Murugan AK, Xing M** 2013 Identification of RASAL1 as a major tumor suppressor gene in thyroid cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 105:1617-1627
68. **Hegedus L** 2004 Clinical practice. The thyroid nodule. *The New England journal of medicine* 351:1764-1771
69. **Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD** 1994 Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 154:1838-1840
70. **Gharib H, Papini E, Paschke R, Duick DS, Valcavi R, Hegedus L, Vitti P, Nodules AAETFoT** 2010 American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules. *Endocr Pract* 16 Suppl 1:1-43

71. **Prazeres H, Torres J, Soares P, Sobrinho-Simoes M** 2010 The familial counterparts of follicular cell--derived thyroid tumors. *International journal of surgical pathology* 18:233-242
72. **Dong C, Hemminki K** 2001 Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 92:144-150
73. **Chaikhoutdinov I, Mitzner R, Goldenberg D** 2014 Incidental Thyroid Nodules: Incidence, Evaluation, and Outcome. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*
74. **Nayan S, Ramakrishna J, Gupta MK** 2014 The Proportion of Malignancy in Incidental Thyroid Lesions on 18-FDG PET Study: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*
75. **Treglia G, Caldarella C, Saggiorato E, Ceriani L, Orlandi F, Salvatori M, Giovanella L** 2013 Diagnostic performance of (99m)Tc-MIBI scan in predicting the malignancy of thyroid nodules: a meta-analysis. *Endocrine* 44:70-78
76. **Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, Panunzi C, Rinaldi R, Toscano V, Pacella CM** 2002 Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1941-1946
77. **Aghini-Lombardi F, Antonangeli L, Martino E, Vitti P, Maccherini D, Leoli F, Rago T, Grasso L, Valeriano R, Balestrieri A, Pinchera A** 1999 The spectrum of thyroid disorders in an iodine-deficient community: the Pescopagano survey. *J Clin Endocrinol Metab* 84:561-566
78. **Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, Dominguez M** 2009 An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1748-1751
79. **Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, Cronan JJ, Doubilet PM, Evans DB, Goellner JR, Hay ID, Hertzberg BS, Intenzo CM, Jeffrey RB, Langer JE, Larsen PR, Mandel SJ, Middleton WD, Reading CC, Sherman SI, Tessler FN, Society of Radiologists in U** 2005 Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology* 237:794-800
80. **Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA** 1987 Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta cytologica* 31:587-590
81. **Cibas ES, Ali SZ** 2009 The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 19:1159-1165
82. **Citologia SPd** PROPOSTA DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE CITOLOGIA (SPC) PARA NOMENCLATURA EM RELATÓRIOS CITOPATOLÓGICOS DE CITOLOGIA ASPIRATIVA DE TIREÓIDE. In: http://www.spcitologia.org/PropClass_BETHESDA_CAAF_TIROID.pdf, acesso a 19/05/2014
83. **Ward LS, Kloos RT** 2013 Molecular markers in the diagnosis of thyroid nodules. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 57:89-97
84. **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** 2011 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* 96:3390-3397
85. **Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, Di Santo A, Caruso G, Carli AF, Brillì L, Montanaro A, Pacini F** 2010 Impact of proto-oncogene

- mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1365-1369
86. **Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, Friedman L, Kloos RT, LiVolsi VA, Mandel SJ, Raab SS, Rosai J, Steward DL, Walsh PS, Wilde JI, Zeiger MA, Lanman RB, Haugen BR** 2012 Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *The New England journal of medicine* 367:705-715
 87. **Udelsman R, Lakatos E, Ladenson P** 1996 Optimal surgery for papillary thyroid carcinoma. *World journal of surgery* 20:88-93
 88. **Sosa JA, Bowman HM, Tielsch JM, Powe NR, Gordon TA, Udelsman R** 1998 The importance of surgeon experience for clinical and economic outcomes from thyroidectomy. *Annals of surgery* 228:320-330
 89. **Shaha A** 2006 Treatment of thyroid cancer based on risk groups. *Journal of surgical oncology* 94:683-691
 90. **Shan CX, Zhang W, Jiang DZ, Zheng XM, Liu S, Qiu M** 2012 Routine central neck dissection in differentiated thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *The Laryngoscope* 122:797-804
 91. **Zetoune T, Keutgen X, Buitrago D, Aldailami H, Shao H, Mazumdar M, Fahey TJ, 3rd, Zarnegar R** 2010 Prophylactic central neck dissection and local recurrence in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Annals of surgical oncology* 17:3287-3293
 92. **McLeod DS, Sawka AM, Cooper DS** 2013 Controversies in primary treatment of low-risk papillary thyroid cancer. *Lancet* 381:1046-1057
 93. **Hughes DT, White ML, Miller BS, Gauger PG, Burney RE, Doherty GM** 2010 Influence of prophylactic central lymph node dissection on postoperative thyroglobulin levels and radioiodine treatment in papillary thyroid cancer. *Surgery* 148:1100-1106; discussion 1006-1107
 94. **Roh JL, Park JY, Park CI** 2007 Total thyroidectomy plus neck dissection in differentiated papillary thyroid carcinoma patients: pattern of nodal metastasis, morbidity, recurrence, and postoperative levels of serum parathyroid hormone. *Annals of surgery* 245:604-610
 95. **Lee YS, Kim SW, Kim SW, Kim SK, Kang HS, Lee ES, Chung KW** 2007 Extent of routine central lymph node dissection with small papillary thyroid carcinoma. *World journal of surgery* 31:1954-1959
 96. **Randolph GW, Duh QY, Heller KS, LiVolsi VA, Mandel SJ, Steward DL, Tufano RP, Tuttle RM, American Thyroid Association Surgical Affairs Committee's Taskforce on Thyroid Cancer Nodal S** 2012 The prognostic significance of nodal metastases from papillary thyroid carcinoma can be stratified based on the size and number of metastatic lymph nodes, as well as the presence of extranodal extension. *Thyroid* 22:1144-1152
 97. **Miguel M, Gracinda C, Francisco C, Manuela C, Paula S** 2013 Radiotherapy: radioiodine and external beam irradiation treatment of differentiated thyroid carcinomas. In: *Clinical Management of Thyroid Cancer: Future Medicine Ltd*; 78-92
 98. **Sawka AM, Thephamongkhon K, Brouwers M, Thabane L, Browman G, Gerstein HC** 2004 Clinical review 170: A systematic review and metaanalysis of the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation for well-differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3668-3676
 99. **Sawka AM, Brierley JD, Tsang RW, Thabane L, Rotstein L, Gafni A, Straus S, Goldstein DP** 2008 An updated systematic review and commentary examining the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation in well-differentiated thyroid cancer. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 37:457-480, x
 100. **Jonklaas J, Sarlis NJ, Litofsky D, Ain KB, Bigos ST, Brierley JD, Cooper DS, Haugen BR, Ladenson PW, Magner J, Robbins J, Ross DS, Skarulis M, Maxon HR, Sherman SI** 2006 Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. *Thyroid* 16:1229-1242

101. **Jonklaas J, Cooper DS, Ain KB, Bigos T, Brierley JD, Haugen BR, Ladenson PW, Magner J, Ross DS, Skarulis MC, Steward DL, Maxon HR, Sherman SI, National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study G** 2010 Radioiodine therapy in patients with stage I differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 20:1423-1424
102. **Schvartz C, Bonnetain F, Dabakuyo S, Gauthier M, Cueff A, Fieffe S, Pochart JM, Cochet I, Crevisy E, Dalac A, Papathanassiou D, Toubeau M** 2012 Impact on overall survival of radioactive iodine in low-risk differentiated thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 97:1526-1535
103. **Jung TS, Kim TY, Kim KW, Oh YL, Park do J, Cho BY, Shong YK, Kim WB, Park YJ, Jung JH, Chung JH** 2007 Clinical features and prognostic factors for survival in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma and comparison to the patients with the aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocrine journal* 54:265-274
104. **Nixon IJ, Ganly I, Patel SG, Palmer FL, Di Lorenzo MM, Grewal RK, Larson SM, Tuttle RM, Shaha A, Shah JP** 2013 The results of selective use of radioactive iodine on survival and on recurrence in the management of papillary thyroid cancer, based on Memorial Sloan-Kettering Cancer Center risk group stratification. *Thyroid* 23:683-694
105. **Walter MA, Turtschi CP, Schindler C, Minnig P, Muller-Brand J, Muller B** 2007 The dental safety profile of high-dose radioiodine therapy for thyroid cancer: long-term results of a longitudinal cohort study. *J Nucl Med* 48:1620-1625
106. **Kloos RT, Duvuuri V, Jhiang SM, Cahill KV, Foster JA, Burns JA** 2002 Nasolacrimal drainage system obstruction from radioactive iodine therapy for thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5817-5820
107. **Rubino C, de Vathaire F, Dottorini ME, Hall P, Schvartz C, Couette JE, Dondon MG, Abbas MT, Langlois C, Schlumberger M** 2003 Second primary malignancies in thyroid cancer patients. *Br J Cancer* 89:1638-1644
108. **Sawka AM, Thabane L, Parlea L, Ibrahim-Zada I, Tsang RW, Brierley JD, Straus S, Ezzat S, Goldstein DP** 2009 Second primary malignancy risk after radioactive iodine treatment for thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid* 19:451-457
109. **Lee J, Yun MJ, Nam KH, Chung WY, Soh EY, Park CS** 2010 Quality of life and effectiveness comparisons of thyroxine withdrawal, triiodothyronine withdrawal, and recombinant thyroid-stimulating hormone administration for low-dose radioiodine remnant ablation of differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 20:173-179
110. **Pacini F, Ladenson PW, Schlumberger M, Driedger A, Luster M, Kloos RT, Sherman S, Haugen B, Corone C, Molinaro E, Elisei R, Ceccarelli C, Pinchera A, Wahl RL, Leboulleux S, Ricard M, Yoo J, Busaidy NL, Delpassand E, Hanscheid H, Felbinger R, Lassmann M, Reiners C** 2006 Radioiodine ablation of thyroid remnants after preparation with recombinant human thyrotropin in differentiated thyroid carcinoma: results of an international, randomized, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 91:926-932
111. **Schlumberger M, Catargi B, Borget I, Deandreis D, Zerdoud S, Bridji B, Bardet S, Leenhardt L, Bastie D, Schvartz C, Vera P, Morel O, Benisvy D, Bournaud C, Bonichon F, Dejax C, Toubert ME, Leboulleux S, Ricard M, Benhamou E, Tumeurs de la Thyroïde Refractaires Network for the Essai Stimulation Ablation Equivalence T** 2012 Strategies of radioiodine ablation in patients with low-risk thyroid cancer. *The New England journal of medicine* 366:1663-1673
112. **Mallick U, Harmer C, Yap B, Wadsley J, Clarke S, Moss L, Nicol A, Clark PM, Farnell K, McCready R, Smellie J, Franklyn JA, John R, Nutting CM, Newbold K, Lemon C, Gerrard G, Abdel-Hamid A, Hardman J, Macias E, Roques T, Whitaker S, Vijayan R, Alvarez P, Beare S, Forsyth S, Kadalayil L, Hackshaw A** 2012 Ablation with low-dose radioiodine and thyrotropin alfa in thyroid cancer. *The New England journal of medicine* 366:1674-1685
113. **Hanscheid H, Lassmann M, Luster M, Thomas SR, Pacini F, Ceccarelli C, Ladenson PW, Wahl RL, Schlumberger M, Ricard M, Driedger A, Kloos RT, Sherman SI, Haugen BR,**

- Carriere V, Corone C, Reiners C** 2006 Iodine biokinetics and dosimetry in radioiodine therapy of thyroid cancer: procedures and results of a prospective international controlled study of ablation after rhTSH or hormone withdrawal. *J Nucl Med* 47:648-654
114. **Taieb D, Sebag F, Farman-Ara B, Portal T, Baumstarck-Barrau K, Fortanier C, Bourrelly M, Mancini J, De Micco C, Auquier P, Conte-Devolx B, Henry JF, Mundler O** 2010 Iodine biokinetics and radioiodine exposure after recombinant human thyrotropin-assisted remnant ablation in comparison with thyroid hormone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 95:3283-3290
115. **Molinaro E, Giani C, Agate L, Biagini A, Pieruzzi L, Bianchi F, Brozzi F, Ceccarelli C, Viola D, Piaggi P, Vitti P, Pacini F, Elisei R** 2013 Patients with differentiated thyroid cancer who underwent radioiodine thyroid remnant ablation with low-activity ¹³¹I after either recombinant human TSH or thyroid hormone therapy withdrawal showed the same outcome after a 10-year follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 98:2693-2700
116. **Fatourechi V, Hay ID, Mullan BP, Wiseman GA, Eghbali-Fatourechi GZ, Thorson LM, Gorman CA** 2000 Are posttherapy radioiodine scans informative and do they influence subsequent therapy of patients with differentiated thyroid cancer? *Thyroid* 10:573-577
117. **Hilditch TE, Dempsey MF, Bolster AA, McMenemin RM, Reed NS** 2002 Self-stunning in thyroid ablation: evidence from comparative studies of diagnostic ¹³¹I and ¹²³I. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 29:783-788
118. **Brabant G** 2008 Thyrotropin suppressive therapy in thyroid carcinoma: what are the targets? *J Clin Endocrinol Metab* 93:1167-1169
119. **Diessl S, Holzberger B, Mader U, Grelle I, Smit JW, Buck AK, Reiners C, Verburg FA** 2012 Impact of moderate vs stringent TSH suppression on survival in advanced differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76:586-592
120. **Hovens GC, Stokkel MP, Kievit J, Corssmit EP, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW** 2007 Associations of serum thyrotropin concentrations with recurrence and death in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2610-2615
121. **Brose MS, Nutting CM, Jarzab B, Elisei R, Siena S, Bastholt L, de la Fouchardiere C, Pacini F, Paschke R, Shong YK, Sherman SI, Smit JW, Chung J, Kappeler C, Pena C, Molnar I, Schlumberger MJ, on behalf of the Di** 2014 Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet ePub* 23/04/2014 as doi: 10.1016/S0140-6736(14)60421-9
122. **Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, Pentlow KS, Zanzonico PB, Haque S, Gavane S, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Dominguez JM, Shen R, Tuttle RM, Larson SM, Fagin JA** 2013 Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *The New England journal of medicine* 368:623-632
123. **Kloos RT, Mazzaferri EL** 2005 A single recombinant human thyrotropin-stimulated serum thyroglobulin measurement predicts differentiated thyroid carcinoma metastases three to five years later. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5047-5057
124. **Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, Caillou B, Ricard M, Lumbroso JD, De Vathaire F, Schlumberger M** 2006 Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2892-2899
125. **Robbins RJ, Wan Q, Grewal RK, Reibke R, Gonen M, Strauss HW, Tuttle RM, Drucker W, Larson SM** 2006 Real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose-positron emission tomography scanning. *J Clin Endocrinol Metab* 91:498-505
126. **Sabra MM, Dominguez JM, Grewal RK, Larson SM, Ghossein RA, Tuttle RM, Fagin JA** 2013 Clinical outcomes and molecular profile of differentiated thyroid cancers with radioiodine-avid distant metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E829-836

127. **Sarlis NJ** 2001 Metastatic thyroid cancer unresponsive to conventional therapies: novel management approaches through translational clinical research. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* 1:103-115
128. **Wexler JA** 2011 Approach to the thyroid cancer patient with bone metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2296-2307
129. **Bernier MO, Leenhardt L, Hoang C, Aurengo A, Mary JY, Menegaux F, Enkaoua E, Turpin G, Chiras J, Saillant G, Hejblum G** 2001 Survival and therapeutic modalities in patients with bone metastases of differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1568-1573
130. **Kushchayev S, Kushchayeva Y, Theodore N, Preul MC, Clark OH** 2010 Percutaneous vertebroplasty for thyroid cancer metastases to the spine. *Thyroid* 20:555-560
131. **Kushchayeva Y, Kushchayev S, Wexler JA, Carroll NM, Preul MC, Teytelboym OM, Sonntag V, Van Nostrand D, Burman KD, Boyle L** 2014 Current Treatment Modalities for Spinal Metastases Secondary to Thyroid Carcinoma. *Thyroid* ePub 23/07/2014 as doi: 10.1089/thy.2013.0634
132. **Sacks W, Braunstein GD** 2014 Evolving approaches in managing radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract* 20:263-275
133. **Hong DS, Cabanillas ME, Wheler J, Naing A, Tsimberidou AM, Ye L, Busaidy NL, Waguespack SG, Hernandez M, El Naggat AK, Bidyasar S, Wright J, Sherman SI, Kurzrock R** 2011 Inhibition of the Ras/Raf/MEK/ERK and RET kinase pathways with the combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in medullary and differentiated thyroid malignancies. *J Clin Endocrinol Metab* 96:997-1005
134. 2014 EMA recommends extending use of Nexavar to include treatment of differentiated thyroid cancer EMA Press Release EMA/242564/2014
135. 2013 FDA Approves Nexavar to Treat Type of Thyroid Cancer. Silver Spring, MD: US Dept of Health and Human Services
136. **Dadu R, Devine C, Hernandez M, Waguespack SG, Busaidy NL, Hu MI, Jimenez C, Habra MA, Sellin RV, Ying AK, Cote GJ, Sherman SI, Cabanillas ME** 2014 Role of salvage targeted therapy in differentiated thyroid cancer patients who failed first-line sorafenib. *J Clin Endocrinol Metab* 99:2086-2094
137. **Kogai T, Brent GA** 2012 The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* 135:355-370
138. **Cohen EE, Rosen LS, Vokes EE, Kies MS, Forastiere AA, Worden FP, Kane MA, Sherman E, Kim S, Bycott P, Tortorici M, Shalinsky DR, Liau KF, Cohen RB** 2008 Axitinib is an active treatment for all histologic subtypes of advanced thyroid cancer: results from a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26:4708-4713
139. **Pennell NA, Daniels GH, Haddad RI, Ross DS, Evans T, Wirth LJ, Fidias PH, Temel JS, Gurubhagavatula S, Heist RS, Clark JR, Lynch TJ** 2008 A phase II study of gefitinib in patients with advanced thyroid cancer. *Thyroid* 18:317-323
140. **S. I. Sherman BJ, M. E. Cabanillas, L. F. Licitra, F. Pacini, R. Martins, B. Robinson, D. Ball, J. McCaffrey, M. H. Shah, D. Bodenner, R. Allison, K. Newbold, R. Elisei, J. P. O'Brien, M. Schlumberger** 2011 A phase II trial of the multitargeted kinase inhibitor E7080 in advanced radioiodine (RAI)-refractory differentiated thyroid cancer (DTC). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29
141. **Sherman SI, Wirth LJ, Droz JP, Hofmann M, Bastholt L, Martins RG, Licitra L, Eschenberg MJ, Sun YN, Juan T, Stepan DE, Schlumberger MJ, Motesanib Thyroid Cancer Study G** 2008 Motesanib diphosphate in progressive differentiated thyroid cancer. *The New England journal of medicine* 359:31-42
142. **Bible KC, Suman VJ, Molina JR, Smallridge RC, Maples WJ, Menefee ME, Rubin J, Sideras K, Morris JC, 3rd, Mclver B, Burton JK, Webster KP, Bieber C, Traynor AM, Flynn**

- PJ, Goh BC, Tang H, Ivy SP, Erlichman C, Endocrine Malignancies Disease Oriented G, Mayo Clinic Cancer C, Mayo Phase C** 2010 Efficacy of pazopanib in progressive, radioiodine-refractory, metastatic differentiated thyroid cancers: results of a phase 2 consortium study. *The lancet oncology* 11:962-972
143. **Hayes DN, Lucas AS, Tanvetyanon T, Krzyzanowska MK, Chung CH, Murphy BA, Gilbert J, Mehra R, Moore DT, Sheikh A, Hoskins J, Hayward MC, Zhao N, O'Connor W, Weck KE, Cohen RB, Cohen EE** 2012 Phase II efficacy and pharmacogenomic study of Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) in iodine-131 refractory papillary thyroid carcinoma with or without follicular elements. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18:2056-2065
144. **Gupta-Abramson V, Troxel AB, Nellore A, Puttaswamy K, Redlinger M, Ransone K, Mandel SJ, Flaherty KT, Loevner LA, O'Dwyer PJ, Brose MS** 2008 Phase II trial of sorafenib in advanced thyroid cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26:4714-4719
145. **Schneider TC, Abdulrahman RM, Corssmit EP, Morreau H, Smit JW, Kapiteijn E** 2012 Long-term analysis of the efficacy and tolerability of sorafenib in advanced radio-iodine refractory differentiated thyroid carcinoma: final results of a phase II trial. *Eur J Endocrinol* 167:643-650
146. **Carr LL, Mankoff DA, Goulart BH, Eaton KD, Capell PT, Kell EM, Bauman JE, Martins RG** 2010 Phase II study of daily sunitinib in FDG-PET-positive, iodine-refractory differentiated thyroid cancer and metastatic medullary carcinoma of the thyroid with functional imaging correlation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16:5260-5268
147. **Leboulleux S, Bastholt L, Krause T, de la Fouchardiere C, Tennvall J, Awada A, Gomez JM, Bonichon F, Leenhardt L, Soufflet C, Licour M, Schlumberger MJ** 2012 Vandetanib in locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 2 trial. *The lancet oncology* 13:897-905
148. **Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, Weiss RE, Degroot LJ, Simon CA, Embia OM, Angelos P, Kaplan EL, Schechter RB** 2013 A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up. *Surgery* 154:1436-1446; discussion 1446-1437
149. **Spencer CA, Lopresti JS** 2008 Measuring thyroglobulin and thyroglobulin autoantibody in patients with differentiated thyroid cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:223-233
150. **Castagna MG, Tala Jury HP, Cipri C, Belardini V, Fioravanti C, Pasqui L, Sestini F, Theodoropoulou A, Pacini F** 2011 The use of ultrasensitive thyroglobulin assays reduces but does not abolish the need for TSH stimulation in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Journal of endocrinological investigation* 34:e219-223
151. **Elisei R, Pinchera A** 2012 Advances in the follow-up of differentiated or medullary thyroid cancer. *Nature reviews. Endocrinology* 8:466-475
152. **Verburg FA, Luster M, Cupini C, Chiovato L, Duntas L, Elisei R, Feldt-Rasmussen U, Rimmele H, Seregini E, Smit JW, Theimer C, Giovanella L** 2013 Implications of thyroglobulin antibody positivity in patients with differentiated thyroid cancer: a clinical position statement. *Thyroid* 23:1211-1225
153. **Heemstra KA, Liu YY, Stokkel M, Kievit J, Corssmit E, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW** 2007 Serum thyroglobulin concentrations predict disease-free remission and death in differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:58-64
154. **Castagna MG, Brilli L, Pilli T, Montanaro A, Cipri C, Fioravanti C, Sestini F, Capezzone M, Pacini F** 2008 Limited value of repeat recombinant human thyrotropin (rhTSH)-stimulated thyroglobulin testing in differentiated thyroid carcinoma patients with previous negative rhTSH-stimulated thyroglobulin and undetectable basal serum thyroglobulin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 93:76-81

155. **Schlumberger MJ** 1998 Papillary and follicular thyroid carcinoma. *The New England journal of medicine* 338:297-306
156. **Torlontano M, Attard M, Crocetti U, Tumino S, Bruno R, Costante G, D'Azzo G, Meringolo D, Ferretti E, Sacco R, Arturi F, Filetti S** 2004 Follow-up of low risk patients with papillary thyroid cancer: role of neck ultrasonography in detecting lymph node metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3402-3407
157. **Leenhardt L, Erdogan MF, Hegedus L, Mandel SJ, Paschke R, Rago T, Russ G** 2013 2013 European thyroid association guidelines for cervical ultrasound scan and ultrasound-guided techniques in the postoperative management of patients with thyroid cancer. *European thyroid journal* 2:147-159
158. **Grani G, Fumarola A** 2014 Thyroglobulin in lymph node fine-needle aspiration wash-out: a systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Clin Endocrinol Metab*:jc20141098
159. **Baudin E, Do Cao C, Cailleux AF, Leboulleux S, Travagli JP, Schlumberger M** 2003 Positive predictive value of serum thyroglobulin levels, measured during the first year of follow-up after thyroid hormone withdrawal, in thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1107-1111
160. **Mosci C, Iagaru A** 2011 PET/CT imaging of thyroid cancer. *Clin Nucl Med* 36:e180-185
161. **Mazzaferrri EL, Jhiang SM** 1994 Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American journal of medicine* 97:418-428
162. **Shaha AR, Shah JP, Loree TR** 1996 Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Annals of surgical oncology* 3:534-538
163. **DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH** 1990 Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 71:414-424
164. **Leboulleux S, Hartl D, Baudin E, Schlumberger M** 2012 [Differentiated thyroid cancer in childhood]. *Bulletin du cancer* 99:1093-1099
165. **Schlumberger M, Challeton C, De Vathaire F, Travagli JP, Gardet P, Lumbroso JD, Francese C, Fontaine F, Ricard M, Parmentier C** 1996 Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastases from thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 37:598-605
166. **Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, Caillou B, Travagli JP, Parmentier C** 1985 Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 55:794-804
167. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A** 2012 Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 62:10-29
168. **Kilfoy BA, Devesa SS, Ward MH, Zhang Y, Rosenberg PS, Holford TR, Anderson WF** 2009 Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18:1092-1100
169. **Nilubol N, Zhang L, Kebebew E** 2013 Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. *Thyroid* 23:695-702
170. **Mazeh H, Sippel RS** 2013 Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*
171. **Mazeh H, Benavidez J, Poehls JL, Youngwirth L, Chen H, Sippel RS** 2012 In patients with thyroid cancer of follicular cell origin, a family history of nonmedullary thyroid cancer in one first-degree relative is associated with more aggressive disease. *Thyroid* 22:3-8
172. **Uchino S, Noguchi S, Kawamoto H, Yamashita H, Watanabe S, Yamashita H, Shuto S** 2002 Familial nonmedullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. *World journal of surgery* 26:897-902
173. **Robenshtok E, Tzvetov G, Grozinsky-Glasberg S, Shraga-Slutsky I, Weinstein R, Lazar L, Serov S, Singer J, Hirsch D, Shimon I, Benbassat C** 2011 Clinical characteristics and

- outcome of familial nonmedullary thyroid cancer: a retrospective controlled study. *Thyroid* 21:43-48
174. **Ito Y, Kakudo K, Hirokawa M, Fukushima M, Yabuta T, Tomoda C, Inoue H, Kihara M, Higashiyama T, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A** 2009 Biological behavior and prognosis of familial papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 145:100-105
 175. **Cunha LL, Ferreira RC, Marcello MA, Vassallo J, Ward LS** 2011 Clinical and pathological implications of concurrent autoimmune thyroid disorders and papillary thyroid cancer. *Journal of thyroid research* 2011:387062
 176. **Dvorkin S, Robenshtok E, Hirsch D, Strenov Y, Shimon I, Benbassat CA** 2013 Differentiated thyroid cancer is associated with less aggressive disease and better outcome in patients with coexisting Hashimotos thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 98:2409-2414
 177. **Belfiore A, Russo D, Vigneri R, Filetti S** 2001 Graves' disease, thyroid nodules and thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:711-718
 178. **Pellegriti G, Mannarino C, Russo M, Terranova R, Marturano I, Vigneri R, Belfiore A** 2013 Increased mortality in patients with differentiated thyroid cancer associated with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1014-1021
 179. **McLeod DS, Watters KF, Carpenter AD, Ladenson PW, Cooper DS, Ding EL** 2012 Thyrotropin and thyroid cancer diagnosis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 97:2682-2692
 180. **McLeod DS, Cooper DS, Ladenson PW, Ain KB, Brierley J, Fein HG, Haugen BRM, Jonklaas J, Magner J, Ross DD, Young MSM, Steward D, Maxon H, Sherman SI** 2013 Prognosis of Differentiated Thyroid Cancer in Relation to Serum TSH And Thyroglobulin Antibody Status at Time of Diagnosis. *Thyroid* 24:35-42
 181. **Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS, Sturgeon C** 2007 Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Annals of surgery* 246:375-381; discussion 381-374
 182. **Melo M, Costa G, Ribeiro C, Carrilho F, Martins MJ, da Rocha AG, Sobrinho-Simoes M, Carneiro M, Soares P** 2013 Stimulated thyroglobulin at recombinant human TSH-aided ablation predicts disease-free status one year later. *J Clin Endocrinol Metab* 98:4364-4372
 183. **Toubeau M, Touzery C, Arveux P, Chaplain G, Vaillant G, Berriolo A, Riedinger JM, Boichot C, Cochet A, Brunotte F** 2004 Predictive value for disease progression of serum thyroglobulin levels measured in the postoperative period and after (131)I ablation therapy in patients with differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med* 45:988-994
 184. **Kim TY, Kim WB, Kim ES, Ryu JS, Yeo JS, Kim SC, Hong SJ, Shong YK** 2005 Serum thyroglobulin levels at the time of 131I remnant ablation just after thyroidectomy are useful for early prediction of clinical recurrence in low-risk patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1440-1445
 185. **Kendler DB, Vaisman F, Corbo R, Martins R, Vaisman M** 2012 Preablation stimulated thyroglobulin is a good predictor of successful ablation in patients with differentiated thyroid cancer. *Clin Nucl Med* 37:545-549
 186. **Webb RC, Howard RS, Stojadinovic A, Gaitonde DY, Wallace MK, Ahmed J, Burch HB** 2012 The utility of serum thyroglobulin measurement at the time of remnant ablation for predicting disease-free status in patients with differentiated thyroid cancer: a meta-analysis involving 3947 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 97:2754-2763
 187. **Robenshtok E, Grewal RK, Fish S, Sabra M, Tuttle RM** 2013 A low postoperative nonstimulated serum thyroglobulin level does not exclude the presence of radioactive iodine avid metastatic foci in intermediate-risk differentiated thyroid cancer patients. *Thyroid* 23:436-442

188. **Mehanna H, Al-Maqbili T, Carter B, Martin E, Campain N, Watkinson J, McCabe C, Boelaert K, Franklyn JA** 2014 Differences in the Recurrence and Mortality Outcomes Rates of Incidental and Nonincidental Papillary Thyroid Microcarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis of 21 329 Person-Years of Follow-Up. *J Clin Endocrinol Metab*:jc20132118
189. **Rivera M, Ricarte-Filho J, Tuttle RM, Ganly I, Shaha A, Knauf J, Fagin J, Ghossein R** 2010 Molecular, morphologic, and outcome analysis of thyroid carcinomas according to degree of extrathyroid extension. *Thyroid* 20:1085-1093
190. **Radowsky JS, Howard RS, Burch HB, Stojadinovic A** 2013 Impact of Degree of Extra-Thyroidal Extension of Disease on Papillary Thyroid Cancer Outcome. *Thyroid* 24:241-244
191. **Furlan JC, Bedard YC, Rosen IB** 2004 Clinicopathologic significance of histologic vascular invasion in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Journal of the American College of Surgeons* 198:341-348
192. **Mete O, Asa SL** 2011 Pathological definition and clinical significance of vascular invasion in thyroid carcinomas of follicular epithelial derivation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24:1545-1552
193. **Mazzaferri EL, Kloos RT** 2001 Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1447-1463
194. **Iacobone M, Jansson S, Barczynski M, Goretzki P** 2014 Multifocal papillary thyroid carcinoma--a consensus report of the European Society of Endocrine Surgeons (ESES). *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 399:141-154
195. **Kazaure HS, Roman SA, Sosa JA** 2012 Aggressive variants of papillary thyroid cancer: incidence, characteristics and predictors of survival among 43,738 patients. *Annals of surgical oncology* 19:1874-1880
196. **Koo JS, Hong S, Park CS** 2009 Diffuse sclerosing variant is a major subtype of papillary thyroid carcinoma in the young. *Thyroid* 19:1225-1231
197. **Silver CE, Owen RP, Rodrigo JP, Rinaldo A, Devaney KO, Ferlito A** 2011 Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Head & neck* 33:1052-1059
198. **Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E** 2011 Papillary thyroid carcinoma variants. *Head and neck pathology* 5:51-56
199. **Nikiforov YE** 2006 Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocrine pathology* 17:307-317
200. **Mizukami Y, Noguchi M, Michigishi T, Nonomura A, Hashimoto T, Otakes S, Nakamura S, Matsubara F** 1992 Papillary thyroid carcinoma in Kanazawa, Japan: prognostic significance of histological subtypes. *Histopathology* 20:243-250
201. **Kazaure HS, Roman SA, Sosa JA** 2012 Insular thyroid cancer: a population-level analysis of patient characteristics and predictors of survival. *Cancer* 118:3260-3267
202. **Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM** 1987 Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 102:1088-1095
203. **Cady B** 1998 Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition. *Surgical oncology clinics of North America* 7:633-644
204. **Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS** 1993 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* 114:1050-1057; discussion 1057-1058
205. **Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, Cooper DS, Haugen BR, Ho M, Klein I, Ladenson PW, Robbins J, Ross DS, Specker B, Taylor T, Maxon HR, 3rd** 1998 Prospective multicenter study of thyrocarcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. *National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. Cancer* 83:1012-1021

206. **Verburg FA, Mader U, Kruitwagen CL, Luster M, Reiners C** 2010 A comparison of prognostic classification systems for differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72:830-838
207. **Tuttle RM, Tala H, Shah J, Leboeuf R, Ghossein R, Gonen M, Brokhin M, Omry G, Fagin JA, Shaha A** 2010 Estimating risk of recurrence in differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine remnant ablation: using response to therapy variables to modify the initial risk estimates predicted by the new American Thyroid Association staging system. *Thyroid* 20:1341-1349
208. **Jeon MJ, Kim WG, Park WR, Han JM, Kim TY, Song DE, Chung KW, Ryu JS, Hong SJ, Shong YK, Kim WB** 2014 Modified dynamic risk stratification for predicting recurrence using the response to initial therapy in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 170:23-30
209. **Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, Kim KW, Hahn SK, Youn YK, Kim KH, Cho BY, Park do J** 2012 The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer* 118:1764-1773
210. **Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, Faviana P, Mannavola D, Moretti S, Rossi S, Sculli M, Bottici V, Beck-Peccoz P, Pacini F, Pinchera A, Santeusanio F, Elisei R** 2006 Correlation between B-RAFV600E mutation and clinicopathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocrine-related cancer* 13:455-464
211. **Handkiewicz-Junak D, Czarniecka A, Jarzab B** 2010 Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions. *Molecular and cellular endocrinology* 322:8-28
212. **Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Maximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhaes J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M** 2005 Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 446:589-595
213. **Sancisi V, Nicoli D, Ragazzi M, Piana S, Ciarrocchi A** 2012 BRAFV600E mutation does not mean distant metastasis in thyroid papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1745-1749
214. **Ricarte-Filho J, Ganly I, Rivera M, Katabi N, Fu W, Shaha A, Tuttle RM, Fagin JA, Ghossein R** 2012 Papillary thyroid carcinomas with cervical lymph node metastases can be stratified into clinically relevant prognostic categories using oncogenic BRAF, the number of nodal metastases, and extra-nodal extension. *Thyroid* 22:575-584
215. **Xing M** 2010 Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Molecular and cellular endocrinology* 321:86-93
216. **Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, Romei C, Miccoli P, Pinchera A, Basolo F** 2008 BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3943-3949
217. **Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, Yip L, Mian C, Vianello F, Tuttle RM, Robenshtok E, Fagin JA, Puxeddu E, Fugazzola L, Czarniecka A, Jarzab B, O'Neill CJ, Sywak MS, Lam AK, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, Nakayama H, Tufano RP, Pai SI, Zeiger MA, Westra WH, Clark DP, Clifton-Bligh R, Sidransky D, Ladenson PW, Sykorova V** 2013 Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA* 309:1493-1501
218. **Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M** 2007 Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:1341-1349

219. **Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, Basolo F, Miccoli P, Pacini F, Pinchera A, Elisei R** 2008 BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocrine-related cancer* 15:511-520
220. **Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN** 2009 Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2092-2098
221. **Xing M, Haugen BR, Schlumberger M** 2013 Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet* 381:1058-1069
222. **Soares P, Sobrinho-Simoes M** 2009 Is BRAF mutation screening useful for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer? *Future oncology* 5:1225-1229
223. **Soares P, Sobrinho-Simoes M** 2011 Cancer: Small papillary thyroid cancers--is BRAF of prognostic value? *Nature reviews. Endocrinology* 7:9-10
224. **Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, Nikiforov YE** 2009 RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4735-4741
225. **Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, Koizume S, Okamoto N, Kondo T, Masuda M, Miyagi Y** 2012 The associations between RAS mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid* 22:683-689
226. **Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G** 2003 ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21:3226-3235
227. **Jang EK, Song DE, Sim SY, Kwon H, Choi YM, Jeon MJ, Han JM, Kim WG, Kim TY, Shong YK, Kim WB** 2014 NRAS Codon 61 Mutation Is Associated with Distant Metastasis in Patients with Follicular Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 24: 1275-1281
228. **Sassolas G, Hafdi-Nejjari Z, Ferraro A, Decaussin-Petrucci M, Rousset B, Borson-Chazot F, Borbone E, Berger N, Fusco A** 2012 Oncogenic alterations in papillary thyroid cancers of young patients. *Thyroid* 22:17-26
229. **Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE** 2006 Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *The American journal of surgical pathology* 30:216-222
230. **Santoro M, Melillo RM, Fusco A** 2006 RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol* 155:645-653
231. **Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simoes M** 1998 Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *The Journal of pathology* 185:71-78
232. **Puxeddu E, Moretti S, Giannico A, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Cristofani R, Farabi R, Reboldi G, Ribacchi R, Pontecorvi A, Santeusano F** 2003 Ret/PTC activation does not influence clinical and pathological features of adult papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol* 148:505-513
233. **Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE** 2002 PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *The American journal of surgical pathology* 26:1016-1023
234. **Marques AR, Espadinha C, Frias MJ, Roque L, Catarino AL, Sobrinho LG, Leite V** 2004 Underexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in PAX8/PPARgamma-negative thyroid tumours. *Br J Cancer* 91:732-738
235. **Sahin M, Allard BL, Yates M, Powell JG, Wang XL, Hay ID, Zhao Y, Goellner JR, Sebo TJ, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B** 2005 PPARgamma staining as a surrogate for

- PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 90:463-468
236. **Armstrong MJ, Huaitao Y, Yip L, Ohori PN, McCoy KL, Stang MT, Hodak SP, Nikiforova MN, Carty SE, Nikiforov YE** 2014 PAX8/PPARgamma Rearrangement in Thyroid Nodules Predicts Follicular-Pattern Carcinomas, in Particular the Encapsulated Follicular Variant of Papillary Carcinoma. *Thyroid* epub 16/07/2014 as doi: 10.1089/thy.2014.0067
 237. **Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V** 2002 Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3947-3952
 238. **Sobin LH WC** 2002 2002 UICC: TNM classification of malignant tumors. 6th ed ed. New York: Wiley-Liss
 239. **Rodrigues F, Limbert E, Marques AP, Santos AP, Lopes C, Rodrigues E, Borges F, Carrilho F, Castro JJ, Neto J, Salgado L, Oliveira MJ, Grupo de Estudo da T** 2005 [Treatment and follow up protocol in differentiated thyroid carcinomas of follicular origin]. *Acta medica portuguesa* 18:2-16
 240. **Pelttari H, Valimaki MJ, Loyttyniemi E, Schalin-Jantti C** 2010 Post-ablative serum thyroglobulin is an independent predictor of recurrence in low-risk differentiated thyroid carcinoma: a 16-year follow-up study. *Eur J Endocrinol* 163:757-763
 241. **Polachek A, Hirsch D, Tzvetov G, Grozinsky-Glasberg S, Slutski I, Singer J, Weinstein R, Shimon I, Benbassat CA** 2011 Prognostic value of post-thyroidectomy thyroglobulin levels in patients with differentiated thyroid cancer. *Journal of endocrinological investigation* 34:855-860
 242. **Rosario PW, Xavier AC, Calsolari MR** 2011 Value of postoperative thyroglobulin and ultrasonography for the indication of ablation and (1)(3)(1)I activity in patients with thyroid cancer and low risk of recurrence. *Thyroid* 21:49-53
 243. **Sawka AM, Orlov S, Gelberg J, Stork B, Dowar M, Shaytzag M, Tabatabaie V, Freeman JL, Walfish PG** 2008 Prognostic value of postsurgical stimulated thyroglobulin levels after initial radioactive iodine therapy in well-differentiated thyroid carcinoma. *Head & neck* 30:693-700
 244. **Tamilia M, Al-Kahtani N, Rochon L, Hier MP, Payne RJ, Holcroft CA, Black MJ** 2011 Serum thyroglobulin predicts thyroid remnant ablation failure with 30 mCi iodine-131 treatment in patients with papillary thyroid carcinoma. *Nuclear medicine communications* 32:212-220
 245. **Ronga G, Filesi M, Ventroni G, Vestri AR, Signore A** 1999 Value of the first serum thyroglobulin level after total thyroidectomy for the diagnosis of metastases from differentiated thyroid carcinoma. *European journal of nuclear medicine* 26:1448-1452
 246. **Bernier MO, Morel O, Rodien P, Muratet JP, Giraud P, Rohmer V, Jeanguillaume C, Bigorgne JC, Jallet P** 2005 Prognostic value of an increase in the serum thyroglobulin level at the time of the first ablative radioiodine treatment in patients with differentiated thyroid cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 32:1418-1421
 247. **Taieb D, Lussato D, Guedj E, Roux F, Mundler O** 2006 Early sequential changes in serum thyroglobulin after radioiodine ablation for thyroid cancer: possible clinical implications for recombinant human thyrotropin-aided therapy. *Thyroid* 16:177-179
 248. **Pacini F, Molinaro E, Lippi F, Castagna MG, Agate L, Ceccarelli C, Taddei D, Elisei R, Capezzone M, Pinchera A** 2001 Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5686-5690
 249. **Giovanella L, Ceriani L, Suriano S, Ghelfo A, Maffioli M** 2008 Thyroglobulin measurement before rhTSH-aided 131I ablation in detecting metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:659-663

250. **Shaha AR** 2007 TNM classification of thyroid carcinoma. *World journal of surgery* 31:879-887
251. **Mitchell I, Livingston EH, Chang AY, Holt S, Snyder WH, 3rd, Lingvay I, Nwariaku FE** 2007 Trends in thyroid cancer demographics and surgical therapy in the United States. *Surgery* 142:823-828; discussion 828 e821
252. **Leboulleux S, Rubino C, Baudin E, Caillou B, Hartl DM, Bidart JM, Travagli JP, Schlumberger M** 2005 Prognostic factors for persistent or recurrent disease of papillary thyroid carcinoma with neck lymph node metastases and/or tumor extension beyond the thyroid capsule at initial diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5723-5729
253. **Zaydfudim V, Feurer ID, Griffin MR, Phay JE** 2008 The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma. *Surgery* 144:1070-1077; discussion 1077-1078
254. **Xing M** 2005 BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer* 12:245-262
255. **Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA** 2012 BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 97:4559-4570
256. **Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P** 2006 The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocrine-related cancer* 13:257-269
257. **Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M** 2012 BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine* 91:274-286
258. **Danilovic DL, Lima EU, Domingues RB, Brandao LG, Hoff AO, Marui S** 2014 Pre-operative role of BRAF in the guidance of the surgical approach and prognosis of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 170:619-625
259. **Lee KC, Li C, Schneider EB, Wang Y, Somervell H, Krafft M, Umbricht CB, Zeiger MA** 2012 Is BRAF mutation associated with lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer? *Surgery* 152:977-983
260. **Kleiman DA, Sporn MJ, Beninato T, Crowley MJ, Nguyen A, Uccelli A, Scognamiglio T, Zarnegar R, Fahey TJ, 3rd** 2013 Preoperative BRAF(V600E) mutation screening is unlikely to alter initial surgical treatment of patients with indeterminate thyroid nodules: A prospective case series of 960 patients. *Cancer* 119:1495-1502
261. **Alzahrani AS, Xing M** 2013 Impact of lymph node metastases identified on central neck dissection (CND) on the recurrence of papillary thyroid cancer: potential role of BRAFV600E mutation in defining CND. *Endocrine-related cancer* 20:13-22
262. **Soares P, Celestino R, Melo M, Fonseca E, Sobrinho-Simoes M** 2014 Prognostic biomarkers in thyroid cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 464:333-346
263. **Howell GM, Hodak SP, Yip L** 2013 RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist* 18:926-932
264. **Jang EK, Song DE, Sim SY, Kwon H, Choi YM, Jeon MJ, Han JM, Kim WG, Kim TY, Shong YK, Kim WB** 2014 NRAS Codon 61 Mutation Is Associated with Distant Metastasis in Patients with Follicular Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 24:1275-1281
265. **Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, Sun H, El-Naggar AK, Xing M** 2013 Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocrine-related cancer* 20:603-610
266. **Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimasic T, Ghossein RA, Fagin JA** 2013 Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E1562-1566

267. **de Vries MM, Celestino R, Castro P, Eloy C, Maximo V, van der Wal JE, Plukker JT, Links TP, Hofstra RM, Sobrinho-Simoës M, Soares P** 2012 RET/PTC rearrangement is prevalent in follicular Hurthle cell carcinomas. *Histopathology* 61:833-843
268. **Jacques C, Guillotin D, Fontaine JF, Franc B, Mirebeau-Prunier D, Fleury A, Malthiery Y, Savagner F** 2013 DNA microarray and miRNA analyses reinforce the classification of follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E981-989
269. **Liu T, Wang N, Cao J, Sofiadis A, Dinets A, Zedenius J, Larsson C, Xu D** 2013 The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas. *Oncogene ePub* 21/10/2013 as doi: 10.1038/onc.2013.446
270. **Jung CK, Little MP, Lubin JH, Brenner AV, Wells SA, Jr., Sigurdson AJ, Nikiforov YE** 2013 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* 99:E276-E285
271. **Sampson E, Brierley JD, Le LW, Rotstein L, Tsang RW** 2007 Clinical management and outcome of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer presenting with distant metastasis at diagnosis. *Cancer* 110:1451-1456
272. **Nixon IJ, Whitcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, Patel SG, Ganly I** 2012 The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* 22:884-889
273. **Mallick U, Harmer C, Hackshaw A, Moss L, Io NTMG** 2012 Iodine or Not (IoN) for low-risk differentiated thyroid cancer: the next UK National Cancer Research Network randomised trial following HiLo. *Clinical oncology* 24:159-161
274. **Liao ZL, Tang XD, Lu MH, Wu YY, Cao YL, Fang DC, Yang SM, Guo H** 2012 Antitumor effect of new multiple antigen peptide based on HLA-A0201-restricted CTL epitopes of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Cancer science* 103:1920-1928
275. **Dosset M, Vauchy C, Beziaud L, Adotevi O, Godet Y** 2013 Universal tumor-reactive helper peptides from telomerase as new tools for anticancer vaccination. *Oncoimmunology* 2:e23430
276. **Hanahan D, Coussens LM** 2012 Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* 21:309-322

8. - Anexos

8.1. - Artigos

Artigo I

– **Melo M**, Gosta G, Carrilho F, Carvalheiro M, Soares P. Radiotherapy: radioiodine and external beam irradiation treatment of differentiated thyroid carcinomas. Clinical Management of Thyroid Cancer. 1ed. Future Medicine Ltd, 2013, p. 78-92. doi: 10.2217/ebo.12.383

About the Authors



Miguel Melo

Miguel Melo is a specialist in endocrinology at the University Hospital of Coimbra, Portugal. He is also an invited assistant at the Medical Faculty of the University of Coimbra. His main field of interest is thyroid oncology, with a special focus on radioiodine therapy and molecular biology.



Gracinda Costa

Gracinda Costa is a nuclear medicine specialist. She is, at present, Head of the Nuclear Medicine Department of the University Hospital of Coimbra, where she is also responsible for the therapeutic unit. Her main scientific interest focuses on thyroid cancer radioiodine therapy, radiobiology and PET/CT with Iodine-124.



Francisco Carrilho

Francisco Carrilho is Director of the Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism at the University Hospital of Coimbra. His main clinical activity focuses on thyroid cancer and he is the principal coordinator of the Thyroid Cancer Unit of the University Hospital of Coimbra. He was former President and General Secretary of the Portuguese Society of Endocrinology and the Thyroid Section of the Portuguese Society of Endocrinology .



Manuela Carvalheiro

Manuela Carvalheiro is Professor of Endocrinology at the Medical Faculty of Coimbra. She was the former Director of the Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism of the University Hospital of Coimbra. Apart from general endocrinology, she developed basic and clinical investigation in diabetes, focusing on insulin resistance and pregnancy. She was a founder member and President of the Portuguese Society of Endocrinology, Diabetes and Metabolism and the Portuguese Diabetes Society.



Paula Soares

Paula Soares is Assistant Professor of Biopathology at the Medical Faculty of Porto (Portugal). She coordinates the Group of Cancer Biology at the Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto. Her main interests include cell biology, genetics and molecular pathology of thyroid and neuroendocrine tumors.

Chapter

6

Radiotherapy: radioiodine and external beam irradiation treatment of differentiated thyroid carcinomas

Postsurgical remnant ablation	81
Radioiodine therapy of advanced disease	87
Side effects & complications of radioiodine	89
External-beam radiotherapy	90

Miguel Melo, Gracinda Costa,
Francisco Carrilho, Manuela
Carvalho & Paula Soares

Radioiodine has been one of the cornerstones of differentiated thyroid cancer treatment through the last 60 years. It is considered to be a safe and effective therapy modality. In daily practice, Iodine-131 is used in postsurgical thyroid remnant ablation and in the treatment of advanced disease. On the other hand, external beam irradiation has a minor role in the treatment of thyroid cancer. In this chapter, we will discuss, based on recent international guidelines, current indications for radioiodine treatment and external irradiation as well as its side effects.

doi:10.2217/EBO.12.383



Radioiodine is a safe therapy for patients with differentiated thyroid carcinoma.

The current recommendations of international guidelines should be followed until results of new prospective randomized trials are available.

The treatment of differentiated thyroid cancer (DTC) relies on three cornerstones: surgery, (usually a near-total or total thyroidectomy), radioiodine and hormonal therapy with levothyroxine (aimed at maintaining thyroid-stimulating hormone [TSH]

at suppression or in the low-normal range).

Radioiodine therapy consists of the systemic administration of Iodine-131 (^{131}I)-sodium (or potassium) for selective irradiation of normal and/or neoplastic thyroid tissue. Based on the fact that thyrocytes are the body's main iodine reservoir and primary site of the sodium-iodine symporter (NIS) expression, radioiodine is one of the most successful targeted therapies in oncology – it is mainly specific for thyroid cancer cells and emits β -radiation with therapeutic effect. Furthermore, ^{131}I is also a γ -ray emitter, allowing imaging of drug distribution.

As the terminology used may be confusing for non-nuclear medicine physicians, we mention the definition of two of the most used terms. The amount of radioiodine given in a diagnostic or therapeutic procedure should be referred as an '**activity**' and is expressed in Curies (Ci) or Becquerels (Bq), and the radiation absorbed by an organ or tissue is mentioned as the '**absorbed dose**' or the shorter version, 'dose' and is expressed in Gray (Gy).

The introduction of radioiodine in clinical practice occurred in the 1940s, but the definitive evidence supporting radioiodine use comes from a long-term follow-up study, in which more than 1500 patients were included. The results clearly showed that both mortality and recurrences were much lower in the group of patients who received ^{131}I [1].

In recent years, several studies have reported an increase in the incidence of thyroid cancer, both in Europe and North America [2,3]. These numbers are mainly due to an increase in small papillary carcinomas, which are considered as low risk and have an excellent prognosis. For clarification, in this text, we consider that a low-risk DTC is a classic papillary or minimally invasive follicular thyroid carcinoma with no local or distant metastases,

complete resection, no tumor invasion, no vascular invasion and no uptake outside thyroid bed, when radioiodine is used. This increase in the incidence has revitalized the debate on which and to what extent should radioiodine therapies be used in patients presenting in lower stages. In fact, many landmark studies included older patients



Radioiodine therapy: systemic administration of ^{131}I -sodium (or potassium) for selective irradiation of normal and/or neoplastic thyroid tissue.

Activity: amount of radioiodine given in a diagnostic or therapeutic procedure; expressed in Curies (Ci) or Becquerels (Bq).

Absorbed dose: radiation absorbed by an organ or tissue; expressed in Gray (Gy).

with more advanced disease, so their conclusions may not be suitable for current medical practice. Today, a proper balance should be sought between aggressive intervention and consideration of potential side effects. Concerning radioiodine, the recent trend is to use lower activities in selected groups of patients.

There are two main forms of therapy, based on the goal to attain:

- Postsurgical remnant ablation of thyroid tissue, which may be considered as an adjuvant modality;
- Treatment of nonresectable or incompletely resectable tumor lesions.

Postsurgical remnant ablation

Definition & Indications

Radioiodine **ablative therapy** is considered a part of the primary treatment of DTC, to be applied after surgery in most of the patients submitted to total or near-total thyroidectomy. Ablation has three main objectives:

- To destroy any remaining occult tumor deposits, thus decreasing the risk of recurrent disease in the future;
- To eliminate completely any persistent normal thyroid tissue, therefore increasing the sensitivity and specificity of two markers used in the follow-up of patients with DTC – serum thyroglobulin and whole-body scan (WBS);
- To allow a sensitive post-therapy WBS, performed a few days after the high activity of ^{131}I used for ablation. This procedure can detect previously unknown locoregional disease and/or distant metastasis, helping to localize them with great accuracy when single photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT/CT) is used.

In selected cases, radioiodine can allow radioguided surgery, in which a γ -detection probe is used during surgical procedure to localize tumor lesions that are difficult to identify.

The success of ablation is evaluated 6–12 months after the procedure, according to the following criteria [4]:

- Absence of detectable stimulated thyroglobulin, in patients without thyroglobulin antibodies;
- Absence of suspicious findings on neck ultrasound;
- Negative thyroid bed uptake on follow-up diagnostic WBS.

Aq **Ablative therapy:** adjuvant administration of radioiodine after surgery (total or near-total thyroidectomy), aimed at destroying any remaining occult tumor deposits and any persistent normal thyroid tissue.

The benefits of remnant ablation in high-risk patients or in cases of incomplete thyroidectomy have undoubtedly been demonstrated [1]. By contrast, there is still a lack of evidence clearly demonstrating that remnant ablation is beneficial in patients with low- and intermediate-risk tumors [5]. The survival benefits of this procedure have not been unequivocally shown for low-risk patients with stage T1–2N0M0 (according to the International Union against Cancer [UICC] staging system) [6]. In a recent study that included nearly 1300 patients with this stage that were followed for more than 10 years, there was also no difference in disease-free survival between those treated with adjuvant radioiodine and those without adjuvant treatment [7]. Data from the National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Group report [8], in which 2936 patients were included, with a median follow-up of 3 years, found that near-total thyroidectomy followed by radioactive iodine (RAI) and aggressive TSH suppression predicted improved overall survival of patients with stage III and IV, and was also beneficial for most patients with stage II. There was no difference in the group of patients with stage I disease. Of note, National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Group staging criteria are similar to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) system. These findings can be justified by the excellent prognosis of this type of cancer in stage I patients. Nevertheless, the extremely long follow-up necessary to demonstrate a statistical effect on thyroid cancer outcomes may mean other factors are involved. In fact, a systematic review showed that the longer the follow-up of a study is, the more likely it is to show a benefit of RAI [9]. These authors also found that patients with a tumor greater than 1 cm that were submitted to ablation had a significantly lower risk of developing distant metastasis. This indicates that even some patients traditionally considered to be low risk may have some benefit. The group of stage I patients harboring tumors with histologic signs of aggressiveness seems to benefit with ablation [10], although this evidence is recent and has not been shown consistently. It is well known that several histologic features may place the patient at higher risk of recurrence or metastases than would have been predicted by the AJCC staging system. These include some histologic subtypes (solid, tall cell, columnar, insular variants and poorly differentiated thyroid cancer) as well as the presence of vascular invasion. The presence of these features should be combined with patient age, size of the tumor and lymph node status, guiding the clinician in the decision on whether ablation is warranted.

Taking these data into account, current guidelines (summarized in **Table 6.1**) recommend RAI ablation for all patients considered as having a high risk of disease persistence or recurrence, although the definition of 'high risk' is not entirely concordant between them. Both the American

Table 6.1. Indications for radioactive iodine ablation according to different American and European guidelines.

Guideline	No indication (low risk of relapse or cancer-specific mortality)	Probable indication/selective use	Definitive indication
ATA [†] (2009)	Single or multifocal intrathyroidal microcarcinoma (T1 <1 cm), no aggressive histology, NO, MO	Selective use in patients with tumors 1–4 cm (T1–T2) confined to the thyroid, with proven lymph node involvement or when combination of age, histology, tumor size and lymph node status predicts an intermediate to high risk of recurrence or specific mortality	Primary tumor size >4 cm (T3–T4) in the absence of higher risk features or gross extrathyroidal extension of the tumor regardless of tumor size or known distant metastases
ETA [‡] (2006)	Single intrathyroidal microcarcinoma (T1 <1 cm), no aggressive histology, NO, MO	T1 (>1 cm)–T2, NO, MO or no lymph node dissection or age <18 years or less than total thyroidectomy or unfavorable histology	Incomplete tumor resection or complete tumor resection but extension beyond thyroid capsule (T3–T4) or lymph node involvement or distant metastases
EANM [‡] (2008)	Single intrathyroidal papillary microcarcinoma (T1 <1 cm), no aggressive histology, NO, MO, no history of radiation exposure	Individual cases (consider family history of DTC, tumor size, history of neck irradiation, histology, closeness of tumor to the thyroid capsule, presence of vascular invasion)	All the patients not fulfilling previous criteria
ESMO [‡] (2010)	Single intrathyroidal microcarcinoma (T1 <1 cm), no aggressive histology, NO, MO	T1 (>1 cm)–T2, NO, MO or no lymph node dissection or less than total thyroidectomy or aggressive histology	T3–T4 or incomplete tumor resection or locoregional metastases or distant metastases

[†]American study.

[‡]European study.

ATA: American Thyroid Association; DTC: Differentiated thyroid cancer; EANM: European Association of Nuclear Medicine; ESMO: European Society of Medical Oncology; ETA: European Thyroid Association.

Thyroid Association (ATA) [5] and the European Thyroid Association (ETA) [11], together with the European Society of Medical Oncology (ESMO) [12] and the European Association of Nuclear Medicine (EANM) [4], recommend ablative therapy for all patients with primary tumors >4 cm even in the absence of other higher-risk features; for all patients with gross

extrathyroidal extension (regardless of tumor size) and for all patients with distant metastasis. On the other hand, all the guidelines advise no ablation for patients with unifocal microcarcinomas (<1 cm) without other higher-risk features. The ATA also does not recommend the procedure for patients with multifocal microcarcinoma. The presence of lymph node involvement is considered as an indication for routine RAI therapy in the European guidelines, whereas the ATA only recommends its use in selected cases. All the patients not fulfilling the previous criteria are considered as having low or intermediate risk, with probable indication for RAI ablation. Features such as age, tumor size, histology and lymph node involvement (only for the ATA) should be taken into account when deciding the selective use of RAI.

Serum thyroglobulin level is a useful test for further risk stratification after surgery. In low-risk patients and under suppressive levothyroxine treatment, a thyroglobulin level of less than 1 ng/ml has a 98% negative predictive value for subsequent disease persistence or recurrence [13]. Another study assessed the value of stimulated thyroglobulin levels in patients with stage I–IV disease submitted to total thyroidectomy [14]. It was shown that, if the patients had already undetectable thyroglobulin before ablation, the relapse rate was 1% and only occurred in patients with tumors harboring histologic signs of aggressive behavior. The authors proposed that, in the absence of lymph node involvement or unfavorable histology and if patients had undetectable stimulated thyroglobulin levels after surgery, remnant ablation could be avoided.

The therapeutic strategy for differentiated thyroid carcinoma in Japan is different, with narrower indications for both total thyroidectomy and RAI ablation. This strategy is based on the high iodine intake of the population, on the good prognosis of most thyroid tumors and on the limited capacity to administer RAI. Ablation is actively recommended for patients showing vascular invasion, significant extrathyroid extension, multiple lymph node metastases and continuous high thyroglobulin levels after thyroidectomy. Ablative therapy is also advisable for patients with aggressive histologic types [15]. However, it is estimated that only approximately 35% of Japanese patients with indication will undergo RAI ablation, mainly due to lack of availability [16].

Preparation

In order to uptake RAI, thyroid cells must be stimulated by TSH (thyrotropin). A TSH level above 30 mU/l is considered sufficient to ensure the efficacy of therapy in both normal and tumor tissue. This can be achieved by two ways:

- Thyroid hormone withdrawal for 3–5 weeks (endogenous TSH stimulation)
- Administration of recombinant human TSH (rhTSH; exogenous TSH stimulation)



Recombinant human thyroid-stimulating hormone use is recommended in the preparation of routine ablation. Compared with thyroid hormone withdrawal, it avoids hypothyroidism, preserves quality of life and decreases total body irradiation.

Endogenous TSH stimulation is obtained either by the discontinuation of levothyroxine (LT4) for 3–4 weeks or by switching LT4 to liothyronine (LT3) for 2–4 weeks, followed by the withdrawal of LT3. Although the latter approach could decrease the period of time in which patients remain hypothyroid, recent studies do not show any difference in symptoms when LT3 is used. Children can usually achieve adequate serum TSH levels after 2 weeks of LT4 withdrawal [17].

The introduction of rhTSH in clinical practice made it possible to achieve proper serum TSH levels without symptoms and signs of hypothyroidism. This can be particularly relevant for patients unable to tolerate hypothyroidism (e.g., with severe heart disease), as well as for those unable to generate an elevated TSH. Apart from prevention of morbidity associated with hypothyroidism, the advantages of rhTSH include a maintained quality of life and a better radiation profile for critical organs, such as the salivary glands or the gonads. The radiation exposure to other organs is decreased on average by 35%, due to reduced circulation of RAI in the blood when performing treatment in an euthyroid patient [18].

When comparing endogenous or exogenous TSH stimulation for remnant ablation, the rates of success are similar, with 80–90% of patients being successfully ablated in both groups. A randomized, prospective Phase III study in mainly low-risk patients using a standard activity of 100 mCi showed comparable ablation rates of approximately 90% after endogenous or exogenous TSH stimulation [19]. Several retrospective analyses, which included high-risk patients, bared similar results. Recent randomized, prospective studies evaluated the use of 50 mCi [20] and 30 mCi [21,22] of RAI after rhTSH stimulation in comparison with the standard dose of 100 mCi. All of them demonstrated similar ablation rates in the groups prepared by LT4 withdrawal or rhTSH administration, even when smaller doses were used. Based on these findings, rhTSH is now approved by the EMA (using 30–100 mCi of ¹³¹I) and the US FDA (no dose specification), for ablative therapy in patients with tumors with stages T1–T4, N0–N1 and M0. Owing to its equal efficacy and fewer side effects, the ATA, ESMO and EANM recommend preparation for remnant ablation with rhTSH.

The protocol of rhTSH administration includes two intramuscular injections (0.9 mg) in 2 consecutive days. Therapeutic radioiodine is given on the third



The indications, dosimetry and preparation methods are currently under discussion, especially concerning ablative therapies in low-risk patients. Ablation is indicated for high-risk and most intermediate-risk patients.

day and WBS are usually performed between the fifth and the ninth day (Figure 6.1).

Before any RAI treatment, a low-iodine diet (<50 µg/day) for 1–2 weeks is recommended, particularly for those with high iodine intake.

Dosimetry

When performing ablation, the most frequent approach is the administration of a standard fixed dose of RAI. Activities between 30 and 100 mCi seem to show similar rates of successful remnant ablation and recurrence rates. The results of the ESTIMABL [20] and HiLO [19] studies show comparable results with 30 or 100 mCi, either when rhTSH was used or LT4 withdrawn. The ATA recommends the utilization of the minimum activity (30–100 mCi) necessary to achieve successful ablation, particularly for low-risk patients. However, if tumors display a more aggressive histology or if residual microscopic disease is suspected or documented, higher activities (100–200 mCi) can be appropriate.

Scans

Historically, a diagnostic WBS with a low activity of ¹³¹I used to be performed, in order to provide information on the presence of iodine-avid tissue. The recent trend is to avoid pre-therapy scans, due to the lack of accuracy of low-dose scans, its low impact on the decision to ablate and concerns over ¹³¹I-induced stunning. Stunning is defined as a reduction in uptake and efficacy of a ¹³¹I therapeutic dose induced by a prior diagnostic RAI administration. The stunning effect is more prominent with higher activities (5–10 mCi) of ¹³¹I and does not seem to occur if the therapeutic dose is administered in the 72 h after the diagnostic activity. To minimize the risk of stunning, Iodine-123 (¹²³I) can be used, but its short half-life makes this isotope difficult to handle. Furthermore, ¹²³I has lower imaging sensitivity and higher cost than ¹³¹I. Another approach is the determination of thyroid

Figure 6.1. Protocol for administering recombinant human thyroid-stimulating hormone.



rhTSH: Recombinant human thyroid-stimulating hormone; Tg: Thyroglobulin.

bed uptake without scanning, which can be achieved using very low activities (10–100 μCi) of ^{131}I . Iodine-124 (^{124}I) PET/CT is an emerging and attractive modality for pretreatment imaging and dosimetry, and in expert hands, can accurately predict findings on subsequent high-dose post-treatment ^{131}I scans [23]. As a consequence, if a ^{124}I PET/CT does not show radioiodine-avid tissue, the exposure of the patient to a high therapeutic activity of ^{131}I can be prevented. The ATA states that pretreatment scans and/or determination of thyroid bed uptake may be useful when the size of thyroid remnant cannot be ascertained from the surgical report or neck ultrasound, or when the results would alter either the decision to treat or the activity given. When performing a diagnostic scan, a low activity of ^{123}I (1.5–3 mCi) or ^{131}I (<1 mCi) is recommended, and the therapeutic activity should be given within 72 h.

After ablation, a WBS is universally recommended and typically performed 2–10 days after the therapeutic activity is administered, with a trend to perform early scans (2–7 days) when rhTSH is used. When compared with diagnostic scans, post-therapy WBS can detect additional metastatic foci in 10–26% of patients, changing the disease stage in approximately 10% and affecting clinical management in 9–15%. If available, SPECT/CT fusion imaging provides superior lesion localization.

Radioiodine therapy of advanced disease

Indications

Radioiodine is an effective therapy for advanced disease, as long as tumor tissue preserves the ability to uptake iodine. In fact, patients with metastases that accumulate RAI have a much better prognosis than those in which this capability is not present or has been lost in the course of disease. The response to ^{131}I can be especially good in young patients (<20 years), in which long-lasting full remissions can be achieved, even when extensive lesions are present.

For locoregional disease affecting lymph nodes, surgery is usually the treatment of choice, especially in the presence of bulky disease. RAI can also be used adjunctively after surgery if avid tissue is present or suspected.

Regarding lung metastases, therapeutic decisions are based on the size of lesions (micronodular or macronodular), avidity for RAI and stability over time. Micronodular metastases usually respond very well, with highest rates of complete remission. The ATA recommendation is to treat these patients with RAI repeatedly every 6–12 months, as long as lesions continue to uptake iodine and show clinical response. Even though radiation-induced pneumonitis and fibrosis are rare complications of high-dose RAI treatment, their presence



For advanced disease, radioiodine is an effective therapy, being able to induce long-lasting remissions in some cases.

may refrain further treatments. Dosimetry studies may be helpful in preventing this complication in patients with diffuse lung uptake (see later). Patients with macronodular

metastases that uptake iodine should also be treated repeatedly with RAI as long as objective clinical benefit is demonstrated – reduction in the size of lesions, decrease in thyroglobulin levels. Of note, complete remission is rare and survival of these patients remains poor.

The approach to the patient with bone metastases should take into account several criteria, including: risk of neurologic damage for vertebral lesions, risk or presence of pathologic fractures, presence of important pain and potential bone marrow exposure to radiation (for pelvic lesions). In the presence of isolated symptomatic metastasis, surgical resection should always be considered as first-line therapy. RAI should also be considered for lesions that demonstrate iodine uptake and has been associated with improved survival [24], but complete remission is unexpected. External-beam radiation is another option to consider (see later), particularly when bone lesions are located in regions where acute swelling from TSH stimulation may induce neurologic damage.

Brain metastases are rare and typically occur in older patients with aggressive tumors. Surgical resection should always be considered; if unfeasible, external-beam radiation should be considered. Data on RAI treatment of brain lesions are scarce. If metastases demonstrate iodine uptake, RAI could be considered, usually after external radiation and concomitant glucocorticoid therapy, to minimize the effects of tumor swelling.

The prognosis of patients with nonradioiodine-avid lesions falls dramatically, with a 10-year survival rate of less than 50% [5]. The response to traditional systemic chemotherapy is poor, with no more than 25% partial response rates [25]. The absence of RAI uptake is mainly attributed to dedifferentiation, with loss of NIS expression. Several attempts have been made to re-express NIS in these lesions, in order to allow further RAI treatments, but they were largely unsuccessful. The recent emergence of multikinase inhibitors, able to induce short-term clinical benefit in approximately half of these patients, turned these drugs into a valid option to consider in the treatment of advanced disease.

Dosimetry

In the treatment of advanced disease, three approaches can be used: administration of a standard fixed dose of 100–200 mCi; performing individualization of therapy based on the absorbed dose to the blood as a

surrogate of the radiation exposure to organs at risk; and individualization, taking into account quantitative tumor dosimetry. There are no prospective randomized trials demonstrating superior effectiveness of one of these strategies over the other. Nonetheless, individual dosimetry can benefit some patients with advanced disease, particularly when large activities are considered or in the presence of renal failure.

When using empiric amounts of ^{131}I , physicians should refrain from exceeding 200 mCi, especially in older patients, as this activity may exceed the maximum tolerated dose by the bone marrow.

If the absorbed dose to the blood is used for individual dosimetry, the threshold to avoid serious myelotoxicity is established at 2 Gy.

If the option is to calculate an individualized dose predictable to deliver a specific amount of radiation to tumor lesions, high effectiveness is assured when the absorbed dose to tumor deposits is ≥ 80 Gy.

As patients with advanced disease typically require repeated RAI treatments in order to achieve remission or stabilization of disease, concerns were raised about the effectiveness and side effects of high cumulative doses. Apart from selected cases, patients seem not to benefit from cumulative activities over 600 mCi [26]. Furthermore, cumulative activities above 500–600 mCi have been associated with increased risk of secondary malignancies [27].

Preparation

There are no prospective randomized trials comparing rhTSH with LT4 withdrawal in patients with metastatic disease. A recent retrospective study that included 56 patients with metastatic disease found no difference between the two approaches [28]. One small comparative study showed that radiation dose to metastatic tissue could be lower after rhTSH preparation [29]. Based on this, guidelines mention that there are insufficient data to recommend routine RAI therapy of metastatic disease under rhTSH stimulation.

Scans

Whole-body scintigraphy should be performed following every RAI treatment. Whenever available, SPECT/CT of the neck and other anatomic regions of interest is preferable.

Side effects & complications of radioiodine

Treatment with RAI is considered a safe procedure, being associated with a low number of side effects and complications, which are cumulative

dose related. Some of them can be acute and transient, such as a loss or change in taste and sialadenitis. There are also late-onset complications, such as dry mouth, dental caries and nasolacrimal duct obstruction. All of these are manageable with simple measures, like hydration or cholinergic agents.

In patients with diffuse lung disease displaying high RAI uptake who receive multiple treatments, radiation pneumonitis and fibrosis are rare (<1%) but possible events.

Long-term studies have variably report a small increase in secondary malignancies (bone, breast, colorectal, kidney, salivary, leukemia and myeloma) [26]. The risk of secondary malignancies is dose related, with a significant increase found with cumulative activities above 500–600 mCi.

After RAI treatment, minimal transient effects in platelets and white blood cells counts are frequent. Persistent mild decrements are usually only found after high cumulative activities.

RAI therapy is contraindicated in pregnant or breastfeeding women. Female patients treated with RAI should avoid pregnancy for 6–12 months.

External-beam radiotherapy

The indications for external-beam radiation are scarce. Patients with anaplastic thyroid carcinoma seem to benefit from triple therapy – surgery (when feasible), external-beam radiation and chemotherapy – even though the prognosis of these patients remains poor [30]. The other main indication for external-beam radiation is the treatment of nonradioiodine-avid bone metastases. When skeletal lesions arise in locations where tumor swelling due to TSH-stimulation required for RAI treatment may produce neurologic complications, severe pain or fractures, external-beam radiation is also a valid option.

Financial & competing interests disclosure

The authors would like to thank GENZYME-Portugal for funding our work through a research project. The Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto is an Associate Laboratory of the Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education that is partially supported by the Foundation for Science and Technology (FCT). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

 Summary

- In the treatment of differentiated thyroid cancer, radioiodine plays a major role.
- For low-risk patients, the indications for Iodine-131 are under debate. High- and intermediate-risk patients have usually indication for ablative therapy.
- Standard fixed doses of Iodine-131 are usually given to low-risk patients.
- For advanced disease, radioiodine is an effective therapy, being able to induce long-lasting remissions in some cases.
- If available, individual dosimetry may improve the success of treatment in patients with metastatic disease.
- The use of recombinant human thyroid-stimulating hormone in the preparation for radioiodine treatment avoids hypothyroid symptoms, maintains quality of life and reduces whole-body radiation exposure. This approach is recommended for routine ablative therapy.
- The use of recombinant human thyroid-stimulating hormone in the treatment of advanced disease is still off-label, but can benefit selected patients.

References

- 1 Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am. J. Med.* 97(5), 418–428 (1994).
- 2 Reynolds RM, Weir J, Stockton DL *et al.* Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. *Clin. Endocrinol.* 62(2), 156–162 (2005).
- 3 Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988–2005. *Cancer* 115(16), 3801–3807 (2009).
- 4 Luster M, Clarke SE, Dietlein M *et al.* Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35(10), 1941–1959 (2008).
- 5 Cooper D, Doherty G, Haugen B *et al.* Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19(11), 1167–1214 (2009).
- 6 Sawka AM, Thephamongkhon K, Brouwers M *et al.* Clinical review 170: a systematic review and metaanalysis of the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation for well-differentiated thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(8), 3668–3676 (2004).
- 7 Schwartz C, Bonnetain F, Dabakuyo S *et al.* Impact on overall survival of radioactive iodine in low-risk differentiated thyroid cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(5), 1526–1535 (2012).
- 8 Jonklaas J, Sarlis NJ, Litofsky D *et al.* Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. *Thyroid* 16(12), 1229–1242 (2006).
- 9 Sawka AM, Brierley JD, Tsang RW *et al.* An updated systematic review and commentary examining the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation in well-differentiated thyroid cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37(2), 457–480 (2008).
- 10 Jung TS, Kim TY, Kim KW *et al.* Clinical features and prognostic factors for survival in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma and comparison to the patients with the aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocr. J.* 54(2), 265–274 (2007).
- 11 Pacini F, Schlumberger M, Dralle H *et al.* European consensus for the management of patients with differentiated thyroid cancer of the follicular epithelium. *Eur. J. Endocrinol.* 154(6), 787–803 (2006).
- 12 Pacini F, Castagna MG, Brilli L *et al.* Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 21(S5), 214–219 (2010).

- 13 Giovannella L, Ceriani L, Suriano S *et al.* Thyroglobulin measurement before rhTSH-aided ^{131}I ablation in detecting metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 69(4), 659–663 (2008).
- 14 Nascimento C, Borget I, Al Ghuzlan A *et al.* Persistent disease and recurrence in differentiated thyroid cancer patients with undetectable postoperative stimulated thyroglobulin level. *Endocr. Relat. Cancer* 18(2), R29–R40 (2011).
- 15 The Japanese Society of Thyroid Surgery/The Japanese Society of Endocrine Surgeons. *Guidelines for Management of Thyroid Tumor*. Kanehara Press, Tokyo, Japan (2010).
- 16 Takami H, Ito Y, Okamoto T, Yoshida A. Therapeutic strategy for differentiated thyroid carcinoma in Japan based on a newly established guideline managed by Japanese Society of Thyroid Surgeons and Japanese Association of Endocrine Surgeons. *World J. Surg.* 35(1), 111–121 (2011).
- 17 Kuijt WJ, Huang SA. Children with differentiated thyroid cancer achieve adequate hyperthyrotropinemia within 14 days of levothyroxine withdrawal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(11), 6123–6125 (2005).
- 18 Remy H, Borget I, Leboulleux S *et al.* ^{131}I effective half-life and dosimetry in thyroid cancer patients. *J. Nucl. Med.* 49(9), 1445–1450 (2008).
- 19 Pacini F, Ladenson PW, Schlumberger M *et al.* Radioiodine ablation of thyroid remnants after preparation with recombinant human thyrotropin in differentiated thyroid carcinoma: results of an international, randomized, controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(3), 926–932 (2006).
- 20 Pilli T, Brianzoni E, Capocceiti F *et al.* A comparison of 1850 (50 mCi) and 3700MBq (100 mCi) ^{131}I -iodine administered doses for recombinant thyrotropin-stimulated postoperative thyroid remnant ablation in differentiated thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92(9), 3542–3546 (2007).
- 21 Mallick U, Harmer C, Yap B *et al.* Ablation with low-dose radioiodine and thyrotropin alfa in thyroid cancer. *N. Engl. J. Med.* 366(18), 1674–1685 (2012).
- 22 Schlumberger M, Catargi B, Borget I *et al.* Strategies of radioiodine ablation in patients with low-risk thyroid cancer. *N. Engl. J. Med.* 366(18), 1663–1673 (2012).
- 23 Phan HT, Jager PL, Paans AM *et al.* The diagnostic value of ^{124}I -PET in patients with differentiated thyroid cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35(5), 958–965 (2008).
- 24 Bernier MC, Leenhardt L, Hoang C *et al.* Survival and therapeutic modalities in patients with bone metastases of differentiated thyroid carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(4), 1568–1573 (2001).
- 25 Sarlis NJ. Metastatic thyroid cancer unresponsive to conventional therapies: novel management approaches through translational clinical research. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 1(2), 103–115 (2001).
- 26 Huang I, Chou F, Rue-Tsuan L *et al.* Long-term outcomes of distant metastasis from differentiated. *Clin. Endocrinol.* 76(3), 439–447 (2012).
- 27 Sawka AM, Thabane L, Parlea L *et al.* Second primary malignancy risk after radioactive iodine treatment for thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid* 19(5), 451–457 (2009).
- 28 Klubo-Gwiedzinska J, Burman KD, Van Nostrand D *et al.* Radioiodine treatment of metastatic thyroid cancer. *Thyroid* 22(3), 310–317 (2012).
- 29 Pötzi C, Moameni A, Karanikas G *et al.* Comparison of iodine uptake in tumour and nontumour tissue under thyroid hormone deprivation and with recombinant human thyrotropin in thyroid cancer patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 65(4), 519–523 (2006).
- 30 Brierley JD. Update on external beam radiation therapy in thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96(8), 2289–2295 (2011).

Artigo II

- **Melo M**, Costa G, Ribeiro C, Carrilho F, Martins MJ, da Rocha AG, Sobrinho-Simões M, Carvalheiro M, Soares P. Stimulated thyroglobulin at recombinant human TSH-aided ablation predicts disease-free status one year later. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Nov;98(11):4364-72. doi: 10.1210/jc.2013-2267. Epub 2013 Sep 13.

Stimulated Thyroglobulin at Recombinant Human TSH-Aided Ablation Predicts Disease-free Status One Year Later

Miguel Melo, Gracinda Costa, Cristina Ribeiro, Francisco Carrilho, Maria João Martins, Adriana Gaspar da Rocha, Manuel Sobrinho-Simões, Manuela Carvalheiro, and Paula Soares

Departments of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism (M.M., C.R., F.C., M.C.), Nuclear Medicine (G.C.), and Pathology (M.J.M.), University and Hospital Center of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal; Medical Faculty (M.M., M.C.), University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal; Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (M.M., A.G.d.R., M.S.-S., P.S.) 4200-465 Porto, Portugal; Department of Pathology and Oncology (M.S.-S., P.S.), Medical Faculty, University of Porto, 4485-661 Porto, Portugal; and Department of Pathology (M.S.-S.), Hospital Center S. João, 4200-450 Porto, Portugal

Context: Thyroglobulin (Tg) levels measured at the time of remnant ablation after thyroid hormone withdrawal (THW) were shown to have prognostic value in predicting disease-free status.

Objectives: Our objectives were to determine whether stimulated Tg levels, measured at the time of remnant ablation performed under recombinant human TSH (rhTSH) stimulation, has value in predicting absence of detectable disease 1 year after radioiodine therapy and to compare the results obtained with this approach with a cohort of patients submitted to ablation after THW.

Design: This was a prospective observational study.

Setting and Patients: The study included 293 consecutive patients treated for a differentiated thyroid carcinoma with no initial evidence of distant metastasis. All patients were submitted to a total or near-total thyroidectomy, followed by ablation either under rhTSH (n = 151) or endogenous TSH stimulation (n = 142). Patients with positive Tg antibodies were excluded.

Main Outcome Measures: The predictive value of Tg at ablation was assessed by receiver operating characteristic curve analysis.

Results: In the rhTSH group, 96 patients (73.3%) were considered disease-free at 1 year. Stimulated Tg at ablation after rhTSH was found to be an independent prognostic indicator of disease persistence 12 months later. The highest-accuracy cutoff value for absence of detectable disease was defined as 7.2 ng/mL, with a negative predictive value of 90%. In the THW group, Tg at ablation also proved to have independent predictive value. Using the same threshold (7.2 ng/mL), the negative predictive value of Tg was 95% in the THW group.

Conclusions: When rhTSH was used, stimulated Tg at ablation had independent predictive value for disease-free status 1 year later. A low stimulated Tg at rhTSH-aided ablation may be considered a favorable prognosis factor. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: 4364–4372, 2013)

The prognosis of differentiated thyroid carcinoma (DTC) is very good, with a 10-year survival rate higher than 85% in most series (1). The initial approach to a patient with DTC usually consists of surgery, followed by radioactive iodine (RAI) remnant ablation. After the initial approach, follow-up of most patients will rely on serum thyroglobulin (Tg) levels and neck ultrasound. Due to its high negative predictive value (NPV) (2), a stimulated Tg measurement is recommended by most Guidelines and Clinical Practice Recommendations 6 to 12 months after ablation (3–5). In ablated patients, Tg measurements have high sensitivity (85%–95%) for the detection of residual tumor or nontumor thyroid tissue (6). Stimulation of Tg secretion can be performed either by withdrawing levothyroxine for 3 to 5 weeks (endogenous TSH stimulation) or by the administration of recombinant human TSH (rhTSH); in the latter, 2 injections are given on consecutive days and Tg is determined on the fifth day.

The measurement of postoperative Tg levels just before RAI treatment was initially called into question, because normal thyroid remnants would contribute to Tg production. Nevertheless, several studies demonstrated the predictive value of Tg levels measured at ablation under endogenous TSH stimulation (7–10). A meta-analysis examined the predictive value of endogenously stimulated Tg just before ablative treatment on subsequent disease-free status (11); the authors concluded that preablation Tg level is an economical tool with a high NPV, suggesting that a low preablation Tg (below 10 ng/mL) should be considered a favorable risk factor.

It has been demonstrated that rhTSH is a safe and effective way of preparing patients for RAI remnant ablation. When compared with endogenous stimulation, rhTSH conferred similar rates of success (80%–90%) while avoiding signs and symptoms of hypothyroidism and maintaining quality of life in low-, intermediate-, or high-risk patients (12–15). Recent data also demonstrated comparable benefits of RAI therapy for patients with metastatic DTC prepared either with endogenous stimulation or rhTSH (16–18); this issue is still under debate, because previous reports in a limited number of patients raised the possibility of lower RAI uptake from metastatic lesions after rhTSH preparation when compared with thyroid hormone withdrawal (THW) (19, 20). The long-term outcome of patients ablated under rhTSH stimulation also appears to be similar (21–23). Furthermore, the radiation exposure to other organs is decreased on average by 35% (24). In the preparation for RAI ablation, ¹³¹I should be given on day 3 after 2 injections of rhTSH, because this day corresponds to the TSH peak levels in serum. This timeline disallows a stimulated Tg measurement before RAI administration. Moreover, the early sequential changes in

serum Tg after RAI ablation raised concerns about its predictive value when rhTSH is used and Tg is measured after iodine administration (25). Until now, no clinical studies confirmed or discarded this hypothesis.

The objective of the current study was to examine the predictive value of Tg at the time of ablation for disease-free status 1 year after RAI therapy, when rhTSH is used. We compared the results with the data of a similar group of patients that underwent ablation under endogenous TSH stimulation.

Patients and Methods

In this study, we included 293 consecutive patients with a DTC and no evidence of distant metastases at diagnosis, followed at our institution between 2006 and 2011. All the patients were submitted to total or near-total thyroidectomy (in one or two stages) without routine central lymph node dissection, followed by RAI remnant ablation after stimulation with rhTSH (n = 151) or endogenous TSH (n = 142). Two surgical teams were involved, each of them with 4 surgeons experienced in thyroid surgery. The assignment of patients to either group was done by simple random allocation, using a computer-generated list (Random Allocation Software version 1.0) with 2 groups. Patients with poorly differentiated thyroid carcinomas were excluded. In the group prepared with rhTSH, RAI ablation consisted in the administration of 3.7 GBq (100 mCi) ¹³¹I on the third day, preceded by 2 injections of 0.9 mg rhTSH performed on consecutive days, in accordance with standard protocols (3). Endogenously stimulated ablation was performed with 3.7 GBq (100 mCi) ¹³¹I after 4 weeks of THW. A low-iodine diet was recommended in the week preceding RAI treatment. When rhTSH was used, Tg and Tg antibodies (Tg-Abs) at the time of ablation were measured on the fifth day after the first rhTSH injection, corresponding to day 3 after RAI. In the THW group, Tg and Tg-Abs were measured immediately before RAI administration. A whole-body scintigraphy (WBS) was performed 5 to 7 days after the therapeutic activity had been administered in all the patients. Whenever there was suspicion of RAI uptake outside the thyroid bed, single-photon emission computed tomography fusion imaging (SPECT/CT) was used to clarify the region of uptake. The follow-up protocol included neck ultrasound and measurement of TSH, free T₄ (fT₄), Tg, and Tg-Abs while on suppressive L-T₄ treatment 3 months after RAI ablation. Approximately 1 year (9–12 months) after ablation, neck ultrasound was repeated and an rhTSH-stimulated Tg level was obtained, together with Tg-Abs. Patients were considered as being disease-free at 1 year if they had a normal neck ultrasound, a stimulated Tg below 1 ng/mL, and no RAI uptake outside the thyroid bed in post-therapy WBS. All the patients demonstrating positive Tg-Abs at any time during follow-up were excluded.

Adding to the factors previously mentioned, the following data were registered: age at diagnosis, gender, histology, and American Joint Cancer Committee (AJCC)/Union Internationale Contre le Cancer (UICC) TNM staging (sixth edition). In accordance with 2009 American Thyroid Association Guidelines (3), we defined a group of patients harboring tumors with aggressive histology if any of the following features was present:

tall cell variant, solid variant, columnar cell variant, or vascular invasion.

We also took into consideration other factors known to have prognostic significance, including age of the patient (<45 vs ≥45 years old), gender, tumor staging, aggressive histology as previously defined, and presence of lymph node metastases at diagnosis.

Patients with tumors pT1–T2, N0–Nx and no aggressive histology were considered as low-risk, whereas patients harboring tumors T3–T4, N1 or aggressive histology were considered as intermediate- to high-risk.

Patients signed an informed consent form for the study, which was approved by the Internal Reviewing Board.

Serum Tg, TSH, and fT₄ measurement

The Tg was measured using fully automated chemiluminescence assay (IMMULITE 2000; DPC, Buhlmann), with analytical sensitivity of 0.2 ng/mL and functional sensitivity of 0.9 ng/mL. Third-generation Tg-Abs determination was also performed with chemiluminescence assay, with analytical sensitivity of 10 IU/mL and reference value <40 IU/mL (IMMULITE 2000). The presence of Tg-Abs above the reference value was used as criteria for exclusion.

TSH and fT₄ were assayed by chemiluminescence (IMMULITE 2000), with a reference range of 0.4 to 4.0 μIU/mL for TSH and 0.8 to 1.9 ng/dL for fT₄.

Imaging

Post-therapeutic WBS was performed 5 to 7 days after RAI administration, using a dual-head γ-camera (Discovery VH; General Electric). The same equipment allowed single-photon emission computed tomography (SPECT/CT) fusion imaging when required. For quantitative measurement of RAI uptake, we used Molsgaard Medical γ-analyzer type 1600 from 2007 until 2010; afterward, this equipment was replaced by the Capintec Captus 3000 Thyroid Uptake System.

Neck ultrasound was performed with a linear, multifrequency 7.5- to 10.0-Mhz transducer.

Statistics

All statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 (SPSS Inc). Descriptive statistics are presented as numbers of patients and percentages or mean ± SD. The χ² test, χ² test with Yates' correction, and Student's *t* test (2-tailed, unpaired) were used when appropriate. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to define the best cutoff value for Tg at ablation. For the established cutoff value, we calculated sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and NPV. The predictive value of Tg levels and other factors considered (age, gender, T1–4 status [UICC/AJCC], initial lymph node status, staging I–IV [UICC/AJCC], histology [papillary vs follicular], and presence of aggressive histology) were assessed using a uni-

Table 1. Patient Characteristics at Diagnosis: rhTSH-Aided Ablation Group

Parameter	n (%)	Free of Disease, n (%)	Persistent/Recurrent Disease, n (%)	P
Total	131	96 (73.3)	35 (26.7)	
Gender				
Female	107 (81.7)	80 (74.8)	27 (25.2)	.42
Male	24 (18.3)	16 (66.7)	8 (33.3)	
Age, y	47.2 ± 15.0	47.1 ± 14.8	47.3 ± 15.8	.95
<45 yr	58 (44.3)	45 (77.6)	13 (22.4)	.32
≥45 yr	73 (55.7)	51 (59.9)	22 (30.1)	
TNM classification				.13
T1	37 (28.2)	29 (78.4)	8 (21.6)	
T2	36 (27.5)	30 (83.9)	6 (16.7)	
T3	57 (43.5)	36 (63.2)	21 (36.8)	
T4	1 (0.8)	1 (100.0)	0 (0.0)	
N0/Nx	104 (79.4)	87 (83.7)	17 (16.3)	<.001 ^a
N1	27 (20.6)	9 (33.3) ^b	18 (66.7) ^b	
N1a	20 (15.3)	8 (40.0)	12 (60.0)	
N1b	7 (5.3)	1 (14.3)	6 (85.7)	
Stage				.001
I	78 (59.5)	61 (78.2) ^b	17 (21.8) ^b	
II	13 (9.9)	12 (92.3) ^b	1 (7.7) ^b	
III	36 (27.5)	23 (63.9) ^b	13 (36.1) ^b	
IV	4 (3)	0 ^b	4 (100.0) ^b	
Histology				
Papillary	107 (81.7)	77 (72.0)	30 (28.0)	.47
Multifocal	41 (38.3)	30 (73.2)	11 (26.8)	.83
Follicular	24 (18.3)	19 (79.2)	5 (20.8)	.47
Aggressive variant ^c				.03
No	115 (87.8)	88 (76.5)	27 (23.5)	
Yes	16 (12.2)	8 (50.0) ^b	8 (50.0) ^b	

^a Statistical analysis performed comparing N0/Nx vs N1.

^b Significant at univariate analysis.

^c Aggressive histology was defined if any of the following features was present: tall cell variant, solid variant, columnar cell variant, or vascular invasion.

variate and a multivariate logistic regression model (enter method, all the variables were entered in the model in one single step). All variables significantly associated with disease-free status at 1 year were included in the multivariate analysis. Statistical significance was defined by a P value $< .05$.

Results

Group ablated after rhTSH stimulation

A total of 151 patients were initially selected for inclusion, and 19 patients were excluded due to positive Tg-Abs during follow-up; 1 patient was excluded because of missing data.

The clinical data and tumor characteristics of the group ($n = 131$) are summarized in Table 1. A 1-stage surgical procedure was performed in 88 patients (67.2%), and 43 (32.8%) were treated in 2 surgical stages.

Mean age at the time of surgery was 47.2 ± 15.0 years. Mean follow-up time after RAI ablation was 24.3 ± 9.3 months.

A total of 96 patients (73.3%) were considered as being free of disease 1 year after RAI ablation. In the group with persistent or recurrent disease ($n = 35$), 27 (77.1%) displayed elevated Tg levels, 17 (48.6%) had an abnormal neck ultrasound, and 17 (48.6%) presented RAI uptake outside the thyroid bed. From the clinical standpoint, these results corresponded to the presence of proven lymph node metastases in 16 patients (45.7%) who were submitted to fine-needle aspiration cytology with Tg measurement in washout fluid and subsequent surgical resection (2 were considered as N1a and 14 as N1b). Distant metastases to the lung or bone were present in 9 patients (25.7%), and 3 patients (8.6%) presented with local recurrences in the thyroid bed. Nine patients had isolated elevation of stimulated Tg levels at 1 year without further evidence of disease.

Predictive value of Tg at rhTSH-aided ablation

Tg levels at ablation ranged from 0 to 1927 ng/mL, with values significantly higher in the group of patients with persistent or recurrent disease (136.3 ± 341.0 vs 17.9 ± 49.1 ng/mL; $P < .001$).

Undetectable Tg was found in 13 patients. At 1 year, one of them presented with recurrent disease.

Tg levels at ablation were not significantly different between patients submitted to a 1-stage or 2-stage surgical procedure (52.5 ± 214.9 vs 41.6 ± 102.7 ng/mL; $P = .75$).

Before rhTSH administration, the range of TSH levels was 0.01 to $3.7 \mu\text{U/mL}$. All the patients had fT_4 and fT_3 within the reference range.

ROC curve (Figure 1) analysis demonstrated that stimulated Tg at ablation using rhTSH was predictive of

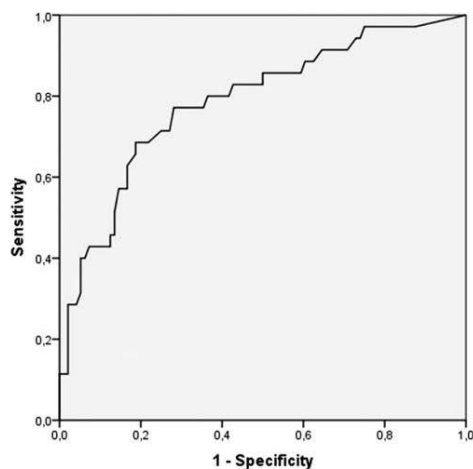


Figure 1. ROC curve of serum Tg measurements at ablation for the diagnosis of persistent/recurrent disease 1 year after RAI ablation (rhTSH-aided ablation group).

disease persistence 1 year later (area under the curve = 0.79 , $\text{SE} = 0.05$, $P < .001$). A cutoff value of Tg level was established at 7.2 ng/mL, with a sensitivity of 80.0%, specificity of 62.5%, PPV of 43.8%, and NPV of 89.6%. This cutoff value was valid for both low-risk patients (NPV = 89.2%) and intermediate- to high-risk patients (NPV = 90.0%) (Supplemental Data, published on The Endocrine Society's Journals Online website at <http://jcem.endojournals.org>).

The presence of initial lymph node metastasis ($P < .001$), aggressive histology ($P = .03$), and higher stage ($P = .001$) were significantly associated with persistent or recurrent disease 1 year later (Table 1).

In multivariate analysis, Tg at ablation appeared as an independent prognostic marker at 1 year, irrespective of the presence of initial lymph node metastases (also an independent prognostic marker), aggressive histology, and higher stage (Table 2).

Group ablated after THW

We performed a similar analysis in the group of 142 patients submitted to RAI ablation after THW. Tg-Abs were present in 17 patients that were excluded from the analysis. Two patients were excluded due to missing data.

The characteristics of the included population ($n = 123$) are shown in Table 3. A 1-stage surgical procedure was performed in 90 patients (73.2%), and 33 (26.8%) were treated in 2 surgical stages.

Table 2. Predictive Factors for Disease Persistence 1 Year After RAI Ablation: rhTSH-Aided Ablation Group

	Persistent Disease, Yes, % of Total	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Tg					
<7.2 ng/mL	7 (10.4)	1 (ref)		1	
>7.2 ng/mL	28 (43.8)	8.2 (2.9–23.1)	<.001	5.5 (2.0–15.4)	.001
Lymph node					
N0/Nx	17 (16.3)	1		1	
N1	18 (66.7)	10.2 (3.9–26.6)	<.001	7.3 (2.4–22.1)	<.001
Stage					
I–II	18 (19.8)	1		1	
III–IV	17 (42.5)	3.0 (1.3–6.8)	.007	1.5 (0.5–4.2)	.47
Aggressive variant					
No	27 (23.5)	1		1	
Yes	8 (50.0)	3.3 (1.1–9.5)	.03	1.8 (0.5–6.3)	.39

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Mean age at the time of surgery was 46.8 ± 15.3 years. Mean follow-up time after RAI ablation was 25.1 ± 8.9 months.

A total of 95 patients (77.2%) were considered as being disease-free 1 year after ablation. In the group with persistent or recurrent disease ($n = 28$), 25 (89.3%) displayed

elevated Tg levels, 16 (57.1%) had an abnormal neck ultrasound, and 11 (39.3%) showed RAI uptake outside the thyroid bed. This corresponded to the presence of proven lymph node metastases in 11 patients (39.3%) (3 were considered as N1a and 8 as N1b); distant metastases (lung or bone) were present in 7 patients (25.0%). Recurrences

Table 3. Patient Characteristics at Diagnosis: THW Group

Parameter	n (%)	Free of Disease, n (%)	Persistent/Recurrent Disease, n (%)	P
Total	123	95 (77.2)	28 (22.8)	
Gender				
Female	104 (84.6)	82 (78.8)	22 (21.2)	.32
Male	19 (15.4)	13 (68.4)	6 (31.6)	
Age, y	46.8 ± 15.3	46.9 ± 15.0	46.3 ± 16.4	.57
<45 yr	57 (46.3)	44 (77.2)	13 (22.8)	.99
≥ 45 yr	66 (53.7)	51 (77.3)	15 (22.7)	
TNM classification				
T1	40 (32.5)	29 (72.5)	11 (27.5)	.40
T2	35 (28.5)	29 (82.9)	6 (17.1)	
T3	44 (35.8)	35 (79.5)	9 (20.5)	
T4	4 (3.3)	2 (50.0)	2 (50.0)	
N0/Nx	103 (87.7)	87 (84.5)	16 (15.5)	<.001 ^a
N1	20 (16.3)	8 (40.0) ^b	12 (60.0) ^b	
N1a	11 (8.9)	5 (45.4)	6 (54.5)	
N1b	9 (7.4)	3 (33.3)	6 (66.7)	
Stage				
I	76 (61.8)	59 (77.6)	17 (22.4)	.08
II	11 (8.9)	9 (81.8)	2 (18.2)	
III	24 (19.5)	21 (87.5)	3 (12.5)	
IV	12 (9.8)	6 (50.0)	6 (50.0)	
Histology				
Papillary	107 (87.0)	83 (77.6)	24 (22.4)	.82
Multifocal	49 (45.8)	38 (77.6)	11 (22.4)	.95
Follicular	16 (13.0)	12 (75.0)	4 (25.0)	.82
Aggressive variant ^c				
No	96 (78.0)	79 (82.3)	17 (17.7)	.01
Yes	27 (22.0)	16 (59.3) ^b	11 (40.7) ^b	

^a Statistical analysis performed comparing N0/Nx vs N1.

^b Significant at univariate analysis.

^c Aggressive histology was defined if any of the following features was present: tall cell variant, solid variant, columnar cell variant, or vascular invasion.

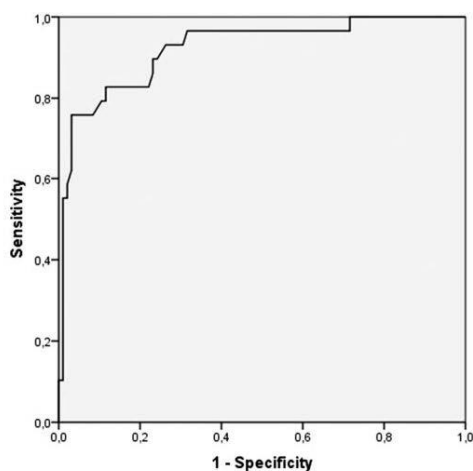


Figure 2. ROC curve of serum Tg measurements at ablation for the diagnosis of persistent/recurrent disease 1 year after RAI ablation (THW group).

in the thyroid bed occurred in 2 patients (7.1%). Ten patients had high levels of stimulated Tg at 1 year without further evidence of disease.

Predictive value of Tg at ablation under endogenous TSH stimulation

Tg levels at ablation ranged from 0 to 691 ng/mL, with values significantly higher in the group of patients with persistent or recurrent disease at 1 year (123.6 ± 166.6 vs 7.7 ± 36.2 ng/mL; $P < .001$).

An undetectable Tg was found in 16 patients. At 1 year, all of them were free of disease.

All patients were hypothyroid before RAI administration, with TSH levels $>30 \mu\text{U/mL}$ (mean = $89.2 \pm 39.4 \mu\text{U/mL}$; range = 31–243 $\mu\text{U/mL}$). We found no correlation between TSH and Tg levels ($r = 0.16$; $P = .09$).

Tg levels at ablation were not significantly different between patients submitted to a 1-stage or 2-stage surgical procedure (35.3 ± 101.3 vs 30.6 ± 88.2 ng/mL; $P = .81$).

In the THW group, Tg measurement at ablation was able to predict the presence of persistent or recurrent disease (area under the curve = 0.93; SE = 0.3 $P < .001$) (Figure 2). When a cutoff value of 7.2 ng/mL was applied, we obtained a sensitivity of 85.7%, a specificity of 83.2%, a PPV of 60.0%, and an NPV of 95.2%. The same cutoff was appropriate for both low-risk (NPV = 95.8%) and intermediate- to high-risk patients (NPV = 91.7%) (Supplemental data).

The presence of lymph node metastasis ($P < .001$) and an aggressive histology variant ($P = .01$) were also predictive of disease persistence 1 year later. Only Tg levels and lymph node metastasis were independent predictors of tumor persistence or recurrence 1 year later (Table 4).

Discussion

The follow-up of patients with DTC relies on serum Tg measurements as an important modality for identifying patients with persistent or recurrent disease, particularly when total or near-total thyroidectomy followed by RAI remnant ablation has been performed. Tests with high NPV are particularly useful in the follow-up of patients with DTC, because they allow the identification of the vast majority of patients unlikely to experience disease recurrence. The definition of disease-free 8 to 12 months after ablation implies an undetectable stimulated serum Tg together with a normal neck ultrasound, provided that there was no uptake outside the thyroid bed in post-treatment WBS (3, 4). This is based on the high NPV of stimulated Tg levels at this time: patients with an undetectable Tg have a 95% to 99.5% likelihood of being completely free of tumor on long-term follow-up (9, 26).

Table 4. Predictive Factors for Disease Persistence 1 Year After RAI Ablation: THW Group

	Persistent Disease, Yes, % of Total	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Tg					
<7.2 ng/mL	4 (4.8)	1 (ref)		1	
>7.2 ng/mL	24 (60.0)	29.6 (9.0–97.1)	<.001	26.0 (7.3–92.5)	<.001
Lymph node					
N0/Nx	16 (15.5)	1		1	
N1	12 (60.0)	8.2 (2.9–23.1)	<.001	7.2 (1.7–30.3)	.007
Aggressive variant					
No	17 (17.7)	1		1	
Yes	11 (40.7)	3.2 (1.3–8.1)	.011	2.56 (0.70–9.32)	.155

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio.

In recent years, several studies assessed the predictive value of serum Tg measured at the time of remnant ablation (7–9, 27–33), after THW. Although there was a wide range of values for sensitivity (47.1%–94.9%), specificity (54.1%–94.1%), and PPV (26.0%–75.0%) among different studies, the NPV showed a much narrower variation (81.6%–99.2%). A meta-analysis involving nearly 4000 patients confirmed that preablation Tg levels can be a useful negative predictor of persistent or recurrent DTC (11). The authors defined a cutoff of 10 ng/mL for optimal sensitivity and specificity. About 70% of patients had Tg levels below this threshold, and the overall NPV was 94.2%.

In this study, we evaluated the predictive value of Tg at the time of rhTSH-aided ablation. Our results show that Tg at ablation was an independent predictor of disease persistence or recurrence 1 year later. Based on the ROC curve analysis, we defined a Tg cutoff of 7.2 ng/mL as being the most adequate for optimal sensitivity and specificity. A patient with a Tg below this threshold had a likelihood of about 10% of having persistent disease 1 year later, and this holds true whether the patient was considered low- or intermediate- to high-risk. For comparison, we performed the same analysis in a clinically similar group of patients ablated after L-T₄ withdrawal. Using the same cutoff, a patient with endogenously stimulated Tg below 7.2 ng/mL had a 5% likelihood of having persistent or recurrent disease.

Although the follow-up time of this study is relatively short, stimulated Tg at rhTSH-aided ablation was able to predict a disease-free status at a critical time during the follow-up of patients with DTC (9, 26). This simple determination has the potential to be used by clinicians as a tool in dynamic risk stratification of the patients and, combined with other factors known to have prognostic implications, may be useful in forecasting a good outcome. In clinical practice, stimulated Tg at ablation may help physicians in establishing the optimal TSH level for the individual patient. Initial TSH suppression (<0.1 mU/L) is recommended for intermediate- and high-risk patients, whereas a TSH at or below the lower limit of the reference range is recommended for low-risk patients (3). Adverse effects of TSH suppression include the known consequences of subclinical thyrotoxicosis, namely exacerbations of ischemic heart disease and atrial fibrillation. Patients with relevant cardiovascular disease are ideal candidates for rhTSH-aided ablation, because a period of hypothyroidism may also deteriorate their health status. The knowledge of the NPV of stimulated Tg at rhTSH-aided ablation may cause the physician to refrain from TSH suppression, an approach that can have important iatrogenic effects in patients with cardiovascular disease. The predictive value of Tg at rhTSH-aided ablation seems

also valid for intermediate- to high-risk patients. This can be helpful in the follow-up strategy of these patients, as less consensus and fewer guidelines are available. A simple test with high NPV has the potential to decrease the frequency of repeated stimulated Tg measurements and neck ultrasounds. Further studies will be necessary to specifically address the aforementioned issues.

When rhTSH is used in the preparation for remnant ablation, Tg is measured in the fifth day after the first injection, 48 hours after RAI administration. A previous study raised concerns about the significance of serum Tg levels whenever rhTSH is used (25). Taïeb et al (25) evaluated the sequential changes in serum Tg after RAI ablation in 26 consecutive hypothyroid patients: Tg levels increased during the next 48 hours after ¹³¹I administration due to thyroid cell damage; furthermore, serum Tg levels measured at 48 hours were not correlated with baseline Tg levels. These data raised the question of whether or not rhTSH-stimulated Tg at ablation could be used as a predictive tool. Our study demonstrates that rhTSH-stimulated serum Tg has predictive value for disease persistence or recurrence 1 year later, in a sample of 131 patients, using a follow-up protocol in accordance with both European and American guidelines. Furthermore, when we compare the results obtained with rhTSH-stimulated and the cohort of patients prepared with THW, the NPV of the test was only slightly higher (89.6% vs 95.2%).

It is well known that TSH levels are a fundamental determinant of Tg levels in the follow-up of patients with DTC. In this study, we found no correlation between TSH and Tg in the THW group. In this setting and as long as there is appropriate stimulation (TSH > 30 μU/mL), it seems that TSH is not a major determinant of Tg levels. A similar analysis is not presented for the rhTSH-aided ablation group, as blood was not collected in the third day (peak TSH) after the first rhTSH injection but only in the fifth day, precluding an accurate investigation of the relationship between peak TSH and Tg levels.

The cutoff value defined in this study is close to the threshold established in most studies performed in hypothyroid conditions. In fact, if the cutoff suggested by Webb et al (11) was used (10 ng/mL) in our series, the NPV would be 89.3% for rhTSH-stimulated Tg and 94.4% for endogenously stimulated Tg (data not shown). When Tg measurement is used for tumor detection in the follow-up of patients with DTC, the stimulated levels were reported to be lower if rhTSH is used in comparison with THW (34). At variance with hypothyroidism, rhTSH-aided ablation requires a Tg test after RAI administration. This can contribute to elevated Tg levels, through RAI-induced cellular damage, in rhTSH-stimulated patients. Although a comparison between absolute stimulated Tg levels per-

formed under different conditions should be made with caution due to the reasons mentioned above, similar cutoff values for the prediction of absence of disease at ablation were found in this cohort.

A study by Giovanella et al (35) evaluated the predictive value of Tg measurement before rhTSH-aided ablative therapy for detecting metastases. Serum Tg was determined while the patients were under T₄ treatment and a highly sensitive Tg assay was used (functional sensitivity = 0.2 ng/mL). The cutoff level for persistent/recurrent disease derived from the ROC curve was 0.65 ng/mL. This study raised the possibility of using postsurgery basal Tg levels determined by a second-generation assay as a predictive tool. Unfortunately, this methodology is not widely available. The fact that most patients were submitted to total thyroidectomy with lymph node dissection in the central compartment may also contribute to the good results obtained with the aforementioned test.

There is controversy about the risk-benefit ratio of prophylactic central compartment node dissection. The procedure allows a more precise staging (36) and may decrease regional recurrence and mortality (37). On the other hand, other studies demonstrated higher morbidity with no reduction in the recurrence rates (38, 39). The absence of routine central lymph node dissection in our hospital may implicate a less precise staging of the patients and may contribute for the relatively high number of local recurrences. In this situation, rhTSH-stimulated Tg at ablation may play an important role as an independent predictive evaluator. Further evidence is required concerning the putative value of rhTSH-stimulated Tg at ablation as a way of predicting disease-free status when prophylactic central-compartment neck dissection is performed.

In conclusion, our results demonstrate that when rhTSH is used, stimulated Tg at ablation may be used as a prognostic marker, allowing the definition of a group of patients with a high probability of being disease-free 1 year after ablation. Based on our data, we recommend an institutional cutoff value similar to the one established for Tg at ablation after THW.

Acknowledgments

We thank Margarida Marques from the Department of Technology and Information of the University Hospital of Coimbra for the valuable review of the statistical analysis.

Address all correspondence and requests for reprints to: Miguel Melo, University Hospital of Coimbra, Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Praceta Mota Pinto, 3000-075 Coimbra, Portugal. E-mail: jmiguelmelo@live.com.pt.

We acknowledge GENZYME for funding our work through a research project. The Institute of Molecular Pathology and

Immunology of the University of Porto (IPATIMUP) is an Associate Laboratory of the Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education that is partially supported by the FCT (Foundation for Science and Technology).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985–1995. *Cancer*. 1998;83:2638–2648.
- Klubo-Gwiedzinska J, Burman KD, Van Nostrand D, Wartofsky L. Does an undetectable rhTSH-stimulated Tg level 12 months after initial treatment of thyroid cancer indicate remission? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;74:111–117.
- American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer; Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19:1167–1214.
- Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:787–803.
- Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Pentheroudakis G. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 5:v214–219.
- Sherman SL. Can serum thyroglobulin levels predict patient outcome after treatment of differentiated thyroid carcinoma? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3:510–511.
- Toubeau M, Touzery C, Arveux P, et al. Predictive value for disease progression of serum thyroglobulin levels measured in the postoperative period and after ¹³¹I ablation therapy in patients with differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med*. 2004;45:988–994.
- Kim TY, Kim WB, Kim ES, et al. Serum thyroglobulin levels at the time of ¹³¹I remnant ablation just after thyroidectomy are useful for early prediction of clinical recurrence in low-risk patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1440–1445.
- Heemstra KA, Liu YY, Stokkel M, et al. Serum thyroglobulin concentrations predict disease-free remission and death in differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66:58–64.
- Kendler DB, Vaisman F, Corbo R, Martins R, Vaisman M. Preablation stimulated thyroglobulin is a good predictor of successful ablation in patients with differentiated thyroid cancer. *Clin Nucl Med*. 2012;37:545–549.
- Webb RC, Howard RS, Stojadinovic A, et al. The utility of serum thyroglobulin measurement at the time of remnant ablation for predicting disease-free status in patients with differentiated thyroid cancer: a meta-analysis involving 3947 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:2754–2763.
- Pacini F, Ladenson PW, Schlumberger M, et al. Radioiodine ablation of thyroid remnants after preparation with recombinant human thyrotropin in differentiated thyroid carcinoma: results of an international, randomized, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:926–932.
- Hugo J, Robenshtok E, Grewal R, Larson S, Tuttle RM. Recombinant human thyroid stimulating hormone-assisted radioactive iodine remnant ablation in thyroid cancer patients at intermediate to high risk of recurrence. *Thyroid*. 2012;22:1007–1015.
- Schlumberger M, Catargi B, Borget I, et al; Tumeurs de la Thyroïde Refractaires Network for the Essai Stimulation Ablation Equivalence T. Strategies of radioiodine ablation in patients with low-risk thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:1663–1673.
- Mallik U, Harmer C, Yap B, et al. Ablation with low-dose radio-

- iodine and thyrotropin alfa in thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:1674–1685.
16. Klubo-Gwiedzinska J, Burman KD, Van Nostrand D, Mete M, Jonklaas J, Wartofsky L. Radioiodine treatment of metastatic thyroid cancer: relative efficacy and side effect profile of preparation by thyroid hormone withdrawal versus recombinant human thyrotropin. *Thyroid*. 2012;22:310–317.
 17. Tuttle RM, Lopez N, Leboeuf R, et al. Radioactive iodine administered for thyroid remnant ablation following recombinant human thyroid stimulating hormone preparation also has an important adjuvant therapy function. *Thyroid*. 2010;20:257–263.
 18. Tala H, Robbins R, Fagin JA, Larson SM, Tuttle RM. Five-year survival is similar in thyroid cancer patients with distant metastases prepared for radioactive iodine therapy with either thyroid hormone withdrawal or recombinant human TSH. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:2105–2111.
 19. Taieb D, Jacob T, Zotian E, Mundler O. Lack of efficacy of recombinant human thyrotropin versus thyroid hormone withdrawal for radioiodine therapy imaging in a patient with differentiated thyroid carcinoma lung metastases. *Thyroid*. 2004;14:465–467.
 20. Driedger AA, Kotowycz N. Two cases of thyroid carcinoma that were not stimulated by recombinant human thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:585–590.
 21. Elisei R, Schlumberger M, Driedger A, et al. Follow-up of low-risk differentiated thyroid cancer patients who underwent radioiodine ablation of postsurgical thyroid remnants after either recombinant human thyrotropin or thyroid hormone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4171–4179.
 22. Rosario PW, Mineiro Filho AF, Lacerda RX, Calsolari MR. Long-term follow-up of at least five years after recombinant human thyrotropin compared to levothyroxine withdrawal for thyroid remnant ablation with radioactive iodine. *Thyroid*. 2012;22:332–333.
 23. Molinaro E, Giani C, Agate L, et al. Patients with differentiated thyroid cancer who underwent radioiodine thyroid remnant ablation with low-activity ¹³¹I after either recombinant human TSH or thyroid hormone therapy withdrawal showed the same outcome after a 10-year follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:2693–2700.
 24. Remy H, Borget I, Leboulleux S, et al. ¹³¹I effective half-life and dosimetry in thyroid cancer patients. *J Nucl Med*. 2008;49:1445–1450.
 25. Taieb D, Lussato D, Guedj E, Roux F, Mundler O. Early sequential changes in serum thyroglobulin after radioiodine ablation for thyroid cancer: possible clinical implications for recombinant human thyrotropin-aided therapy. *Thyroid*. 2006;16:177–179.
 26. Castagna MG, Brilli L, Pilli T, et al. Limited value of repeat recombinant human thyrotropin (rhTSH)-stimulated thyroglobulin testing in differentiated thyroid carcinoma patients with previous negative rhTSH-stimulated thyroglobulin and undetectable basal serum thyroglobulin levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:76–81.
 27. Bernier MO, Mordel O, Rodien P, et al. Prognostic value of an increase in the serum thyroglobulin level at the time of the first ablative radioiodine treatment in patients with differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:1418–1421.
 28. Pelttari H, Valimäki MJ, Löyttyneimi E, Schalin-Jääntti C. Post-ablative serum thyroglobulin is an independent predictor of recurrence in low-risk differentiated thyroid carcinoma: a 16-year follow-up study. *Eur J Endocrinol*. 2010;163:757–763.
 29. Polachek A, Hirsch D, Tzvetov G, et al. Prognostic value of post-thyroidectomy thyroglobulin levels in patients with differentiated thyroid cancer. *J Endocrinol Invest*. 2011;34:855–860.
 30. Rosario PW, Xavier AC, Calsolari MR. Value of postoperative thyroglobulin and ultrasonography for the indication of ablation and ¹³¹I activity in patients with thyroid cancer and low risk of recurrence. *Thyroid*. 2011;21:49–53.
 31. Sawka AM, Orlov S, Gelberg J, et al. Prognostic value of postsurgical stimulated thyroglobulin levels after initial radioactive iodine therapy in well-differentiated thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2008;30:693–700.
 32. Tamilia M, Al-Kahtani N, Rochon L, et al. Serum thyroglobulin predicts thyroid remnant ablation failure with 30 mCi iodine-131 treatment in patients with papillary thyroid carcinoma. *Nucl Med Commun*. 2011;32:212–220.
 33. Ronga G, Filesi M, Ventroni G, Vestri AR, Signore A. Value of the first serum thyroglobulin level after total thyroidectomy for the diagnosis of metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med*. 1999;26:1448–1452.
 34. Pacini F, Molinaro E, Lippi F, et al. Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:5686–5690.
 35. Giovannella L, Ceriani L, Suriano S, Ghelfo A, Maffioli M. Thyroglobulin measurement before rhTSH-aided ¹³¹I ablation in detecting metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69:659–663.
 36. Bonnet S, Hartl D, Leboulleux S, et al. Prophylactic lymph node dissection for papillary thyroid cancer less than 2 cm: implications for radioiodine treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:1162–1167.
 37. Podnos YD, Smith D, Wagman LD, Ellenhorn JD. The implication of lymph node metastasis on survival in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Am Surg*. 2005;71:731–734.
 38. Roh JL, Park JY, Park CI. Total thyroidectomy plus neck dissection in differentiated papillary thyroid carcinoma patients: pattern of nodal metastasis, morbidity, recurrence, and postoperative levels of serum parathyroid hormone. *Ann Surg*. 2007;245:604–610.
 39. Lee YS, Kim SW, Kim SW, et al. Extent of routine central lymph node dissection with small papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2007;31:1954–1959.

Table 1- Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of established Tg cutoff (7.2 ng/mL) for the low-risk and intermediate to high-risk groups (rhTSH-aided ablation group)

Cutoff=7.2 ng/mL	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Overall	80.0	62.5	43.8	89.6
Low-risk	55.6	58.9	17.9	89.2
Intermediate to high-risk	88.5	67.5	63.9	90.0

Table 2- Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of established Tg cutoff (7.2 ng/mL) for the low-risk and intermediate to high-risk groups (THW group)

Cutoff=7.2 ng/mL	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Overall	85.7	83.2	60.0	95.2
Low-risk	85.7	82.1	54.6	95.8
Intermediate to high-risk	78.6	84.6	64.7	91.7

Table 3- Number of patients in each category of anatomic distribution (N1a, N1b) and of number of metastatic lymph nodes. Numbers between parentheses represent patients in whom extranodal growth was documented.

	Number of metastatic lymph nodes		
	1-2	3-6	>6
rhTSH group			
N1a	17 (8)	3 (0)	0
N1b	3 (2)	3 (1)	1 (1)
THW group			
N1a	5 (2)	5 (2)	1 (0)
N1b	2 (1)	3 (2)	4 (2)

Artigo III

- Vinagre J*, Almeida A*, Pópulo H*, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, **Melo M**, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M, Lima J, Máximo V, Soares P. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. Nat Commun. 2013;4:2185. doi: 10.1038/ncomms3185.

* Autores com contribuição idêntica para o trabalho

ARTICLE

Received 19 Apr 2013 | Accepted 25 Jun 2013 | Published 26 Jul 2013

DOI: 10.1038/ncomms3185

Frequency of *TERT* promoter mutations in human cancers

João Vinagre^{1,2,*}, Ana Almeida^{1,2,*}, Helena Pópulo^{1,*}, Rui Batista¹, Joana Lyra^{1,3}, Vasco Pinto^{1,3}, Ricardo Coelho^{1,2}, Ricardo Celestino¹, Hugo Prazeres^{1,4}, Luis Lima^{2,5,6,7}, Miguel Melo^{8,9}, Adriana Gaspar da Rocha^{1,3}, Ana Preto^{1,10}, Patrícia Castro¹, Lígia Castro^{3,11}, Fernando Pardal¹², José Manuel Lopes^{1,3,11}, Lúcio Lara Santos⁵, Rui Manuel Reis^{13,14}, José Cameselle-Teijeiro¹⁵, Manuel Sobrinho-Simões^{1,3,11}, Jorge Lima^{1,3}, Valdemar Máximo^{1,3} & Paula Soares^{1,3}

Reactivation of telomerase has been implicated in human tumorigenesis, but the underlying mechanisms remain poorly understood. Here we report the presence of recurrent somatic mutations in the *TERT* promoter in cancers of the central nervous system (43%), bladder (59%), thyroid (follicular cell-derived, 10%) and skin (melanoma, 29%). In thyroid cancers, the presence of *TERT* promoter mutations (when occurring together with *BRAF* mutations) is significantly associated with higher *TERT* mRNA expression, and in glioblastoma we find a trend for increased telomerase expression in cases harbouring *TERT* promoter mutations. Both in thyroid cancers and glioblastoma, *TERT* promoter mutations are significantly associated with older age of the patients. Our results show that *TERT* promoter mutations are relatively frequent in specific types of human cancers, where they lead to enhanced expression of telomerase.

¹Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), 4200-465 Porto, Portugal. ²Institute of Biomedical Sciences of Abel Salazar, University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal. ³Medical Faculty, University of Porto, 4200-319 Porto, Portugal. ⁴Portuguese Institute of Oncology—Coimbra Centre (IPOFG, EPE), 3000-075 Coimbra, Portugal. ⁵Experimental Pathology and Therapeutics Group, Portuguese Institute of Oncology, 4200-072 Porto, Portugal. ⁶Núcleo de Investigação em Farmácia, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Health School of the Polytechnic Institute of Porto, 4400-330 Vila Nova de Gaia, Portugal. ⁷Research Department, Portuguese League Against Cancer (Norte), 4200-177 Porto, Portugal. ⁸Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, University Hospital of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal. ⁹Unit of Endocrinology, Medical Faculty, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal. ¹⁰Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal. ¹¹Department of Pathology, Hospital S. João, 4200-319 Porto, Portugal. ¹²Department of Pathology, Hospital de Braga, 4710-243 Braga, Portugal. ¹³Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal. ¹⁴Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, CEP 14784-400 São Paulo, Brazil. ¹⁵Department of Pathology, Clinical University Hospital, SERGAS, Medical Faculty, University of Santiago de Compostela, IDIS, 15706 Santiago de Compostela, Spain. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S. (email: psoares@ipatimup.pt).

Reactivation or re-expression of telomerase is referred to be a widespread feature in human cancers, although the genetic basis remains poorly understood in many cancer types. Somatic mutations in the coding region of *TERT* (human telomerase reverse transcriptase) are infrequent in human tumours, but germline and somatic mutations in *TERT* promoter were recently found in a high percentage of human melanomas and human cancer cell lines^{1,2}. Such mutations occurred in two hotspot positions, located -124 and -146 bp upstream from the ATG start site (-124 G>A and -146 G>A, C>T on opposite strand) and conferred enhanced *TERT* promoter activity^{1,2}, by putatively generating a consensus binding site (GGAA) for ETS transcription factors within the *TERT* promoter region^{1,2}.

Our aim was to investigate whether the aforementioned *TERT* promoter mutations were present in cancer types other than melanoma, having for that matter screened 741 primary tumours from the thyroid, kidney, bladder, gastrointestinal stromal tumour (GIST), adrenal medulla (phaeochromocytomas) and central nervous system (CNS). Besides skin melanoma, we have also included ocular melanoma (not studied in the previous reports), benign lesions of the thyroid and skin and 58 human cancer-derived cell lines. Our results highlight *TERT* promoter mutations as frequent events in specific types of human cancers.

Results

***TERT* mutations in tumours and cell lines.** Overall, *TERT* promoter mutations were found in 142 (19%) human tumour samples (Table 1; Fig. 1a) and 14 (24%) human cell lines (Fig. 1b; Supplementary Tables S1 and S2). The -124-bp mutation was the most frequent, being present in 99 cases, whereas the -146-bp mutation was present in 43 cases. The -124 G>A and -146 G>A mutations were found in a mutually exclusive fashion. Two tandem GG>AA mutations at positions -124/-125 and -138/-139 bp were observed in one cell line each (Supplementary Fig. S1 and Supplementary Table S1). *TERT* promoter mutations were not detected in normal thyroid tissue nor in benign lesions (nevi, thyroiditis, goitres and adenomas). No mutations were detected in 26 kidney cancers, 17 phaeochromocytomas and 36 GISTs.

***TERT* mutations in melanoma.** We have analysed both skin and ocular melanomas, a type of melanoma that was not previously studied^{1,2}. *TERT* mutations were present in 16 out of 56 (29%) skin melanomas, but absent in the 25 ocular melanomas (Table 1). All the four skin melanoma-derived cell lines but none of the six ocular melanoma-derived cell lines harboured *TERT* mutations (Fig. 1b and Supplementary Table S1). Ten out of 16 (63%) skin melanomas with *TERT* mutation also harboured the *BRAFV600E* mutation, whereas the *BRAF* mutation was present in 9 out of 38 (24%) melanomas without *TERT* mutation ($P=0.01$, Fisher's exact test, two-sided) (Supplementary Fig. S2 and Supplementary Table S3).

***TERT* mutations in CNS tumours.** In CNS tumours, *TERT* promoter mutations were found in 43% (51/118) of all cases with an equal prevalence of both mutations (Table 1 and Supplementary Table S4). The frequency of *TERT* mutations was different according to the tumour histology and grade (Fig. 1c): although pilocytic astrocytomas (World Health Organization (WHO) grade 1) and diffuse astrocytoma (WHO grade 2) showed a lower frequency of mutations (8% and 15%, respectively), the most aggressive form, glioblastoma multiforme (GBM; WHO grade 4), present the highest frequency of *TERT* mutations (62%). Oligodendrogliomas (WHO grade 2) and anaplastic

Table 1 | Prevalence of *TERT* promoter recurrent mutations in human cancers.

Organ/tissue	Number	<i>TERT</i> mutation, N (%)
Melanocytes		
Nevi	9	0
Skin melanoma	56	16 (29%)
Ocular melanoma	25	0
CNS		
Pilocytic astrocytoma	13	1 (8%)
Diffuse astrocytoma	20	3 (15%)
Oligodendroglioma	22	10 (45%)
Anaplastic oligodendroglioma	24	13 (54%)
Glioblastoma	39	24 (62%)
Thyroid		
Benign	81	0
PTC	169	13 (8%)
FTC	64	9 (14%)
PDTC	14	3 (21%)
ATC	16	2 (13%)
MTC	28	0
Bladder		
Low grade	21	14 (67%)
High grade	61	34 (56%)
Kidney		
CCRCC	12	0
CromRCC	4	0
PRCC	10	0
Adrenal		
Phaeochromocytoma	17	0
GI		
GIST	36	0
Total	741	142 (19%)

ATC, anaplastic thyroid carcinoma; CCRCC, clear cell renal cell carcinoma; CNS, central nervous system; CromRCC, chromophobe renal cell carcinoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; GI, gastrointestinal; GIST, gastrointestinal stromal tumour; MTC, medullary thyroid carcinoma; PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma; PRCC, papillary renal cell carcinoma; PTC, papillary thyroid carcinoma.

oligodendrogliomas (WHO grade 3) also harboured a high frequency of *TERT* mutations (45% and 54%, respectively).

The presence of *TERT* mutations was significantly associated with a higher mean age at diagnosis (Supplementary Table S5) in CNS patients as a whole ($P<0.0001$; Mann-Whitney test, two-tailed) and also in GBM patients only ($P=0.0247$; Mann-Whitney test, two-tailed); in oligodendroglioma patients, we found the same trend, although not statistically significant ($P=0.0709$; Mann-Whitney test, two-tailed). In addition, we observed that, in a subset of 14 GBM (8 *TERT* wild-type tumours and 6 *TERT*-mutated tumours), the tumours with *TERT* mutations showed a trend to increased immunohistochemistry (IHC) expression of telomerase, although this difference was not statistically significant ($P=0.4250$; Mann-Whitney test, two-tailed) (Fig. 2).

***TERT* mutations in thyroid cancer.** We analysed a large series of follicular cell-derived thyroid samples including normal thyroid ($n=27$), benign ($n=81$) and malignant lesions ($n=263$) (Table 1 and Supplementary Table S6). *TERT* mutations were only detected in malignant tumours (10%) (Fig. 1d), namely in

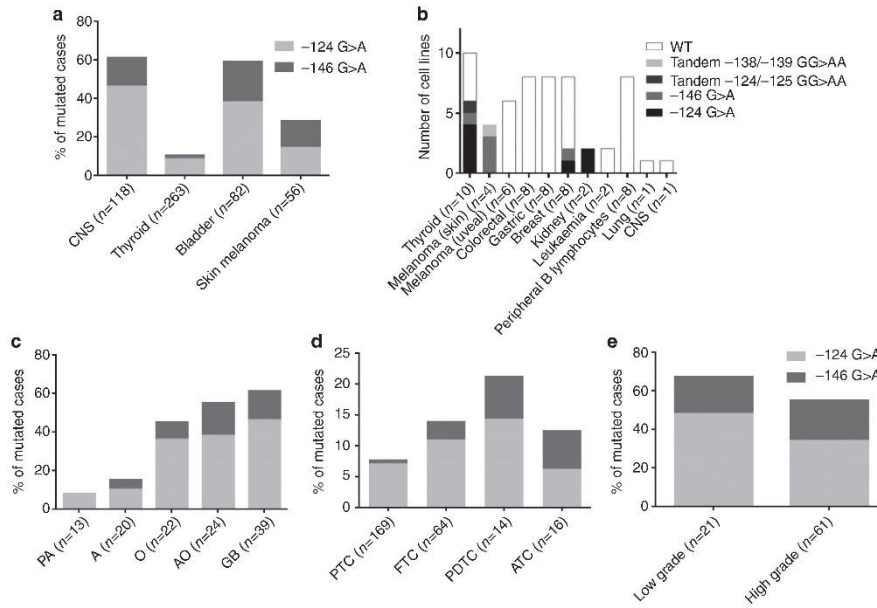


Figure 1 | Frequency and schematic illustration of *TERT* promoter mutations in human cancers. Graphics depict the overall frequency of *TERT* mutations in the four tumour types where *TERT* mutations were detected (a) and a bar plot showing the number of cell lines of different origin that harbour *TERT* mutations (b). The frequency and type of *TERT* mutations in different histological subtypes of CNS (c), thyroid (d) and bladder (e) tumours is also shown. A, diffuse astrocytoma; AO, anaplastic oligodendroglioma; ATC, anaplastic thyroid carcinoma; GB, glioblastoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; O, oligodendroglioma; PA, pilocytic astrocytoma; PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma.

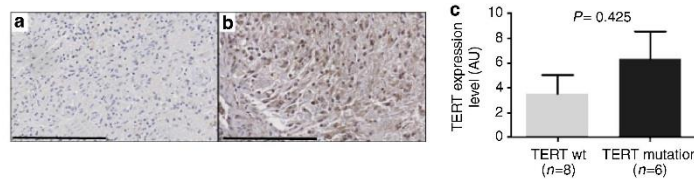


Figure 2 | IHC for *TERT* in two glioblastomas. (a) A tumour without *TERT* expression and without *TERT* mutation. (b) A tumour with positive staining both in nucleus and cytoplasm that also harboured a *TERT* mutation. The graph (c) displays quantification of *TERT* nuclear expression level (IHC) in glioblastomas with and without *TERT* mutation. We have measured the extent (<25%, 25–50%, 50–75% and >75%) and the intensity (absent, faint, moderate or strong) of *TERT* nuclear staining in 14 glioblastomas (eight *TERT* wild type and six *TERT* mutant). The scoring was performed by two independent observers and is the product of extent and intensity of the staining (Methods). Scale bar, 200 μ m. There is a trend to higher *TERT* expression in *TERT*-mutated gliomas, although the difference was not statistically significant ($P = 0.4250$; Mann–Whitney test, two-tailed). Bars represent s.e.m.

11% of papillary thyroid carcinomas (PTCs), 14% of follicular thyroid carcinomas, 21% of poorly differentiated thyroid carcinomas and 13% of the anaplastic thyroid carcinomas. Within the group of PTC, *TERT* mutations were detected to be associated to the so-called conventional PTC (cPTC) (11%). The majority of *TERT*-mutated thyroid cancers harboured the $-124\text{ G} > \text{A}$ mutation (22 out of 27 cases) (Fig. 1d and Supplementary Table S7). In thyroid cancer patients, *TERT* mutations were significantly associated with guarded prognosis features such as larger tumours ($P = 0.008$; Mann–Whitney test, two-tailed),

older patients ($P < 0.0001$; Mann–Whitney test, two-tailed) and male gender ($P = 0.0312$; Fisher’s exact test, two-sided) (Supplementary Table S5). After histotype stratification, such correlations were only kept in the group of cPTC where we also found significant associations with lymph node metastasis ($P = 0.0318$; Fisher’s exact test, two-sided) and *BRAFV600E* mutation ($P = 0.001$; Fisher’s exact test, two-sided) (Supplementary Fig. S2 and Supplementary Table S8). Accordingly, we verified by quantitative RT-PCR (qPCR) that *TERT* mRNA is expressed at variable amounts in thyroid tumours, and

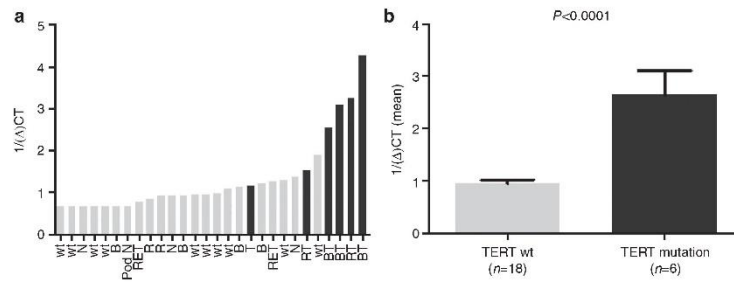


Figure 3 | Quantification of *TERT* mRNA expression level in thyroid tumours. We have performed qPCR in normal thyroid tissue (N), a pool of mRNA of nine normal thyroids (pool N) and thyroid tumours with different genetic backgrounds: without known genetic alterations (wt), with *BRAF* mutation (B), with *RET* rearrangement (RET), with *RAS* mutation (R), with *TERT* mutation (T), with *TERT* and *BRAF* mutations (BT) or with *RAS* and *TERT* mutations (RT). (a) Each bar represents *TERT* mRNA expression in an individual tumour measured in triplicate. *TERT* mRNA levels were normalized against *TBP* mRNA levels. (b) Quantification of *TERT* mRNA mean expression level in thyroid tumours with and without *TERT* mutation. Error bars represent s.e.m. The difference is statistically significant ($P < 0.0001$, unpaired *t*-test).

the ones with coexistent *TERT* and *BRAF* mutations showed the highest levels of *TERT* mRNA expression ($P = 0.0001$, unpaired *t*-test; Fig. 3).

***TERT* mutations in bladder cancer.** In bladder cancer, *TERT* mutations were frequently detected (48/82; 59%) both in low-grade tumours (14/21; 67%) and high-grade tumours (34/61; 56%) (Table 1 and Fig. 1e; Supplementary Table S9). The $-124 G > A$ mutation was present in 30 cases, whereas the $-146 G > A$ was found in 18 cases. No association was found between the presence of the mutation and the age of the patients.

No mutations were detected in 26 kidney cancers, 17 pheochromocytoma and 36 GISTs (Supplementary Tables S10, S11 and S12, respectively).

Discussion

Recent findings have described that *TERT* promoter mutations arise as a novel mechanism of telomerase reactivation/expression in human cancers^{1,2}. In this work, we report for the first time the presence of these mutations in different histotypes of thyroid cancer, and our results validate the findings reported by others in melanoma, bladder and gliomas¹⁻³. Furthermore, we present for the first time evidence showing that *TERT* promoter mutations are significantly associated with increased *TERT* mRNA expression in thyroid cancers. We also found a trend for increased telomerase expression in cases of GBM harbouring *TERT* promoter mutations. In thyroid cancers, *TERT* mRNA was particularly high in cases harbouring both *TERT* and *BRAF* mutations.

The location of these mutations in the *TERT* promoter, rather than the coding region of the gene, creating additional binding sites for transcription factors, represents also a novel mechanism of genetic activation in cancer.

The frequency of *TERT* mutations we detected in skin melanomas is similar to that reported by Horn *et al.*¹ in primary melanomas (33%), but lower than the frequency found by the same authors in metastatic melanomas (85%) and by Huang *et al.*² in a series of 70 melanomas and short-term cultures^{1,2}. In our series, we have analysed few metastatic melanomas that did not show a significantly higher percentage of *TERT* mutations. As our series is too small to allow a conclusion, it remains to be verified if there is an increased

frequency of *TERT* mutations in metastatic melanomas, as suggested by previous reports^{1,2}.

We have confirmed, in skin melanomas, the significant association between *TERT* and *BRAF* mutations, as previously advanced by Horn *et al.*¹, which we now also demonstrate in thyroid cancers. Interestingly, in benign nevi, which frequently harbour *BRAF* mutations, we did not detect *TERT* mutations. This finding, together with the high frequency of *TERT* mutations in metastatic melanomas¹, suggests that, although *BRAF* mutations are thought to be an early event in melanoma genesis, *TERT* mutations may occur at a later stage.

No *TERT* promoter mutations were found in ocular melanomas, which, at variance with skin melanomas, harbour *GNAQ* mutations instead of *BRAF* mutations^{4,5}. Our results further support the assumption that ocular melanomas result from different etiopathogenic mechanism than skin melanomas^{5,6}.

Our data on CNS tumours indicate that *TERT* promoter mutations are frequent events in gliomas, particularly in GBM where the highest mutation frequency was found. It has been shown that *TERT* mutations conferred enhanced *TERT* promoter activity *in vitro*^{1,2}; our findings fit with this assumption because we observed that GBM with *TERT* promoter mutations appear to display increased telomerase expression, despite the limited sensitivity of IHC and the low number of cases analysed. Our results are also in concordance with those of Lotsch *et al.*⁷ who reported that 60% of GBMs were positive for *TERT* mRNA and telomerase activity⁷. It will be interesting to assess whether the GBM positive for telomerase activity described by Lotsch *et al.*⁷ also harbour *TERT* promoter mutations. Our findings also indicate that *TERT* mutations are associated with older patients, in accordance with a recent report³. The high frequency of *TERT* mutations in CNS tumours, particularly in intermediate and high-grade tumours, opens a window for new approaches in the therapy of CNS tumours.

In thyroid cancer, *TERT* mutations were only found in follicular cell-derived cancers (PTC, follicular thyroid carcinoma, poorly differentiated thyroid carcinoma and anaplastic thyroid carcinoma). No mutations were detected in medullary thyroid carcinomas, as described by Killela *et al.*³, nor in normal thyroid and benign lesions, such as goitre, adenomas or thyroiditis; this finding fits with previous studies that reported telomerase expression in malignant lesions and not in normal tissue or hyperplastic lesions^{8,9}. *TERT* mutations were associated with clinicopathological features (older age, increased tumour size and

male gender), but, after histotype stratification, these associations were only maintained in cPTC. Studies in larger series will be necessary to clarify these associations. In cPTC, *TERT* mutations were associated with *BRAF* mutation, highlighting the coexistence of activation of *BRAF* and *TERT*, previously reported in melanoma¹ (Supplementary Fig. S2). Our results reinforce the hypothesis of a link between *BRAF* activation and telomerase expression, which can be mediated by transcription factors binding to the newly created consensus binding sites, as previously advanced by Horn *et al.*¹. Both in thyroid carcinoma and melanoma, it seems that a 'background' status of activated *BRAF* enhances the effects of *TERT* promoter mutation. Our results in *TERT* mRNA expression strengthen this assumption, showing, for the first time, an increased *TERT* expression in tumours harbouring *BRAF* and *TERT* mutation (Fig. 3). Further observational and mechanistic studies are needed to clarify these points.

TERT alterations seem to constitute an early and frequent event in bladder cancer. These findings fit with the high prevalence of telomerase activity previously described in bladder tumours¹⁰. The recurrent hotspot mutations in *TERT* were advanced to be, in melanomas, induced by ultraviolet radiation². Bladder is a target for several chemical carcinogens; it remains to be found whether *TERT* mutations can also result from the action of such agents. The identification of *TERT* mutations in urine may provide a biomarker for early diagnosis and monitoring of bladder cancer.

No *TERT* mutations were detected in kidney cancers, nor in 17 pheochromocytoma and 36 GISTs. The underlying reasons for the tissue specificity of *TERT* mutations remain to be clarified. We can hypothesize that *TERT* mutations can be present in two settings. As described by Killela *et al.*³, *TERT* mutations can be relevant in tissues with relative low rates of self-renewal, which fits with our findings in follicular cell-derived thyroid cancer and gliomas where they are associated with the older age of the patients. On the other hand, these mutations can also result from environmental factors such as ultraviolet radiation and chemical carcinogens as suggested by their high frequency in melanoma, bladder and tongue¹⁻³. In summary, our data identify *TERT* mutations as common events in human cancers and support the assumption that *TERT* promoter mutations may be one of the mechanisms that underlies telomerase reactivation in several types of human tumours.

Methods

Human cancer samples. All the procedures described in this study were in accordance with national and institutional ethical standards and previously approved by Local Ethical Review Committees. According to Portuguese law, informed consent is not required for retrospective studies.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from nine cases of sporadic nevi, 56 cases of sporadic skin melanomas and 25 cases of ocular melanoma were retrieved from the files of the Hospital S. João (HSJ)/Medical Faculty of Porto (FMUP), Porto, Portugal, the Department of Pathology of HSJ and the Department of Pathology of Hospital S. Marcos (HSM), Braga, Portugal. Clinicopathological and follow-up data were retrieved from the files of the Department of Pathology, Department of Dermatology and Oncology Registry of HSJ and Department of Pathology of HSM, and from RORENO (Oncology Registry of North Region). All skin melanoma cases were re-evaluated and staged according to the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer¹¹. The overall female:male ratio was 1.2:1. The mean age of the patients was 58 years for females (s.d. \pm 17.6), with a range from 9 to 94 years, and 62 years for males (s.d. \pm 13.1), with a range from 33 to 79 years.

Follow-up data were available for 53 patients, including the diagnosis of metastases, through the evaluation of the patients or direct interview with their relatives and by review of in-hospital patient files/RORENO. The mean follow-up time of patients was 41 months (range 1–170). During follow-up, 5 (9%) patients developed (lymph node, liver or brain) metastases and 8 (15%) patients died due to malignant melanoma. The remaining patients were alive and without evidence of melanoma recurrence at the last follow-up. Additional information regarding the

melanoma subtype, age, gender, thickness and molecular analysis of *TERT*, *BRAF* and *NRAS* is compiled in Supplementary Table S3.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from 372 tumours and tumour-like lesions of the thyroid and 27 normal thyroids were collected from the files of IPATIMUP, HSJ/FMUP and the Portuguese Institute of Oncology, Coimbra, Portugal. The histology of all tumour samples was revised, and the final classification was made according to the WHO criteria¹². In Supplementary Tables S6 and S7, we have summarized the information regarding histological classification of the lesions, gender, mean age of the patients, molecular data and the size of the tumours.

Representative formalin-fixed paraffin-embedded samples from 118 gliomas were retrieved from pathology archives of the Department of Pathology of HSJ/FMUP and the Department of Pathology of HSM, Braga, Portugal. The tumours were reviewed and classified according to the WHO classification of CNS tumours (2007) (ref. 13,14). This cohort includes lesions that were classified as pilocytic astrocytoma ($n=13$), astrocytoma grade 2 ($n=20$), oligodendroglioma ($n=22$), anaplastic oligodendroglioma ($n=24$) and glioblastoma ($n=39$). Further information regarding the CNS cases is available in Supplementary Table S4.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were collected from 82 patients with non-muscle invasive bladder cancer who underwent transurethral resection of the bladder malignant tumours in the Portuguese Institute of Oncology, Porto. Haematoxylin-eosin-stained sections were reviewed according to the standard histopathological examination by two independent pathologists. Staging and grading were conducted according to the American Joint Committee on Cancer¹¹, and the 2004 WHO classification system¹⁵. Supplementary Table S9 summarizes the clinicopathological parameters.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from 26 kidney cancers were collected from the HSJ/FMUP. Cases were classified as clear cell renal cell carcinoma ($n=12$), chromophobe renal cell carcinoma ($n=4$) and papillary renal cell carcinoma ($n=10$). Information addressing the diagnosis, age, gender, nuclear grade and staging is obtainable in Supplementary Table S10.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from 17 pheochromocytomas were collected from the HSJ/FMUP and IPATIMUP, Porto, Portugal. Supplementary Table S11 summarizes the clinicopathological parameters.

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from 36 GIST were collected from the HSJ/FMUP and IPATIMUP, Porto, Portugal. Tumours were classified according to the WHO pathological classification¹⁶, and the parameters analysed in each case included: age, gender and tumour size. These data and the molecular characterization of these tumours can be observed in Supplementary Table S12.

Cell lines. DNA from 58 cell lines deposited in IPATIMUP cell line bank was retrieved. All the cell lines were authenticated using DNA profile analysis, obtained with the PowerPlex 16 system (Promega, Madison, USA), according to the DNA profiles available in American Type Culture Collection and Health Science Research Resource Bank.

DNA extraction. DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues was retrieved from 10- μ m cuts after careful microdissection. DNA extraction was performed using the Ultraprep Tissue DNA Kit (AHN Biotechnologie, Nordhausen, Germany) following the manufacturer's instructions.

RNA extraction. Total RNA was extracted from frozen thyroid tumours ($n=24$) and normal tissue specimens ($n=3$) using a Trizol commercial kit (Life Technologies, GIBCO BRL, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. RNA was quantified spectrophotometrically, and its quality was checked by analysis of 260/280nm and 260/230nm ratios.

PCR and Sanger sequencing. Coding regions of *BRAF*, *GNAQ*, *HRAS*, *NRAS*, *ckIT* and *PDGFR* were screened for mutations in DNA extracted from paraffin blocks using PCR and Sanger sequencing. The genetic characterization of part of the tumours had already been previously reported. For information on primers and PCR conditions, see refs 5,17,18. To screen for *TERT* promoter mutations, we analysed the hotspots previously identified by PCR followed by Sanger sequencing. *TERT* promoter mutation analysis was performed with the pair of primers FwTERT: 5'-CAGCGGTGCTGAAACTC-3' and RwTERT: 5'-GTCCGTGCCCC TTCACCTT-3'. Amplification of genomic DNA (25–100 ng) was performed by PCR using the Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sequencing reaction was performed with the ABI Prism BigDye Terminator Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA), and the fragments were run in an ABI prism 3100 Genetic Analyser (Perkin-Elmer). The sequencing reaction was performed in a forward direction, and an independent PCR amplification/sequencing, both in a forward and reverse direction, was performed in positive samples or samples that were inconclusive.

Quantitative RT-PCR. qPCR for human *TERT* was performed in 28 thyroid samples, 24 tumours and 3 normal tissue specimens. We also included a normal reference that was produced by pooling RNAs from nine samples of normal thyroid tissue¹⁹.

For cDNA preparation, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using the RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Burlington, ON, Canada). Reverse transcription products were amplified for the *TERT* by qPCR (IDT; no. HS.PT.56a.40985589) using TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with *TBP* gene (TATA-binding protein) as endogenous control (Applied Biosystems; no. 4326322E-0705006). The ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. *TBP* and *TERT* amplifications were done in triplicate using 1 µl of cDNA (~50 ng) for each sample. The relative quantification of target genes was determined using the $\Delta\Delta C_T$ method, which was previously validated by Livak's Linear Regression Method (slope = 0.0696) (Sequence Detector User Bulletin 2; Applied Biosystems).

Immunohistochemistry. IHC for telomerase was performed in representative tumour tissue sections of 14 glioblastomas. Briefly, deparaffinized and rehydrated sections were subjected to microwave treatment in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0, for antigen retrieval. The sections were incubated overnight at 4 °C in a humidified chamber with the primary antibody telomerase (polyclonal, rabbit, 1:500) from Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertville, PA. The detection was performed with a labelled streptavidin–biotin immunoperoxidase detection system (Thermo Scientific/Lab Vision, Fremont, USA), and the immunohistochemical staining was developed with 3,3'-diaminobenzidine substrate. Omission of the primary antibody incubation was used as negative control. Previously tested liver cancer case was used as positive control. IHC evaluation was performed independently by two observers (V.M. and J.L.). An IHC score was established, which corresponded to the product of the intensity of expression (absent = 0, faint = 1, moderate = 2 and strong = 3) with the tumour extent of protein expression (0–25% = 0, 26–50% = 1, 51–75% = 2 and >75% = 3) (ref. 6).

Statistical analysis. Statistical analysis was conducted with StatView for Windows, version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC). The results are expressed as a percentage or mean \pm s.d. Statistical analysis was performed both on the whole series and considering the different groups of lesions. For the analysis of the relationship between patients' age, tumour size and *TERT* status of the tumours, we used the unpaired *t*-test, Mann–Whitney test and analysis of variance. Fisher's exact test was used in the statistical analysis of the other parameters. Graphs and figures were done in GraphPad v6.0. Results were considered statistically significant if $P < 0.05$.

References

- Horn, S. *et al.* *TERT* promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* **339**, 959–961 (2013).
- Huang, F. W. *et al.* Highly recurrent *TERT* promoter mutations in human melanoma. *Science* **339**, 957–959 (2013).
- Killela, P. J. *et al.* *TERT* promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 6021–6026 (2013).
- Van Raamsdonk, C. D. *et al.* Frequent somatic mutations of *GNAQ* in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**, 599–602 (2009).
- Populo, H., Vinagre, J., Lopes, J. M. & Soares, P. Analysis of *GNAQ* mutations, proliferation and MAPK pathway activation in uveal melanomas. *Br. J. Ophthalmol.* **95**, 715–719 (2011).
- Populo, H., Soares, P., Rocha, A. S., Silva, P. & Lopes, J. M. Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Res.* **20**, 107–117 (2010).
- Lotsch, D. *et al.* Prognostic significance of telomerase-associated parameters in glioblastoma: effect of patient age. *Neuro. Oncol.* **15**, 423–432 (2013).
- Soares, P. *et al.* Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Curr. Genomics* **12**, 609–617 (2011).
- Capezone, M. *et al.* Telomere length in neoplastic and nonneoplastic tissues of patients with familial and sporadic papillary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1852–E1856 (2011).
- Sanchini, M. A. *et al.* Relevance of urine telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *JAMA* **294**, 2052–2056 (2005).
- Edge, S. B. *et al.* *AJCC Cancer Staging Manual* (Springer, 2010).
- DeLellis, R. A., L.R., Heitz, P. U. & Eng, C. (eds) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Glands* (IARC Press, 2004).
- Kleihues, P. & Cavenee, W. K. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System* (IARC Press, 2000).
- Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
- Sauter, G. *et al.* in *WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs* (eds Eble, J.N., Sauter, G., Epstein, J.I. & Sesterhenn, I.A.) (IARC Press, 2004).
- Fletcher, C. D. *et al.* Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum. Pathol.* **33**, 459–465 (2002).
- Soares, P. *et al.* BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* **22**, 4578–4580 (2003).
- Celestino, R. *et al.* Molecular alterations and expression of succinate dehydrogenase complex in wild-type KIT/PDGFRA/BRAF gastrointestinal stromal tumors. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 503–510 (2013).
- Prazeres, H. *et al.* Chromosomal, epigenetic and microRNA-mediated inactivation of LRP1B, a modulator of the extracellular environment of thyroid cancer cells. *Oncogene* **30**, 1302–1317 (2011).

Acknowledgements

We thank to Mrs Mafalda Rocha for the excellent technical support in the sequencing work. This work was partially supported by the Portuguese Science and Technology Foundation (FCT) through BPD (SFRH/BPD/85249/2012 to H.P.), PhD (SFRH/BD/81940/2011 to J.V. and SFRH/BD/79135/2011 to A.A.) and BI grants, and the grant through the Program Ciência 2008 (J.L.) and the project (PIC/IC/83037/2007). Further funding was obtained from the project 'Microenvironment, metabolism and cancer' partially supported by Programa Operacional Regional do Norte (ON2—O Novo Norte), under the Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN), and through the Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER). IPATIMUP is an associate laboratory of the Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education and is partially supported by the FCT.

Author contributions

J.V., A.A. and H.P. contributed equally to the work. P.S. and V.M. jointly supervised the research. P.S. conceived the study. P.S., V.M. and J.L. designed the experiments. J.V., A.A., H.P., J.L., V.P., R.C., R.Ce., R.B., P.C., H.P., M.M. and A.R. performed the DNA extraction and mutation analysis experiments. R.B. performed the qPCR experiments. H.P. performed the IHC studies. M.S.S., L.C., J.C.-T. and J.M.L. performed the tumour classification. A.P., L.L., F.P., L.L.S. and R.R. provided tumour samples, reagents and collected the clinicopathological data. P.S., V.M., J.L., J.V., H.P., R.B. and M.S.S. wrote the paper with the contribution of all the other authors.

Additional information

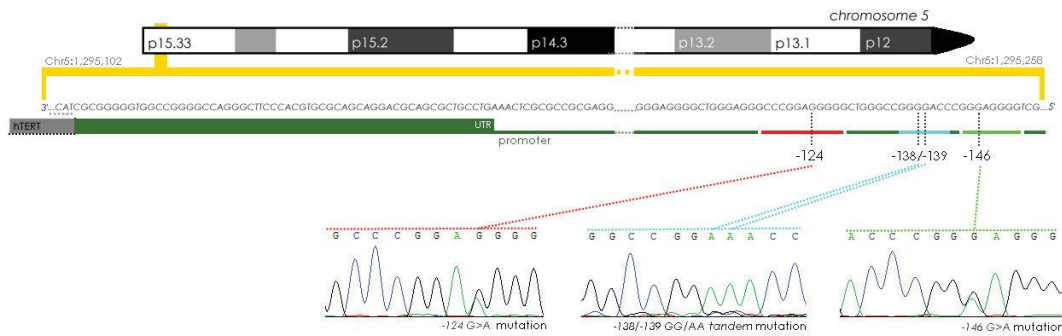
Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

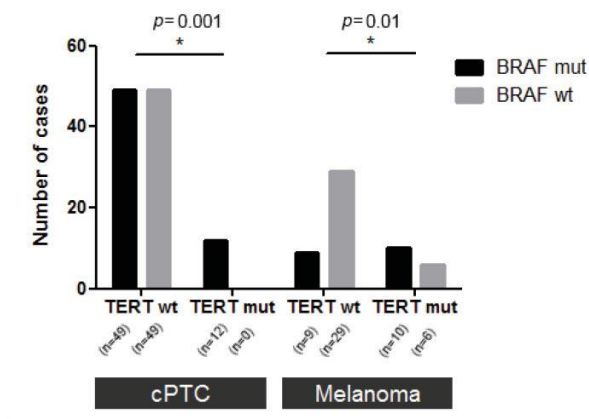
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Vinagre, J. *et al.* Frequency of *TERT* promoter mutations in human cancers. *Nat. Commun.* **4**:2185 doi: 10.1038/ncomms3185 (2013).

SUPPLEMENTARY INFORMATION FOR JVINAGRE - NCOMMS-13-03296-A



Supplementary Figure S1 - The panel illustrates the three mutations identified in this study and their location in chromosome 5 in relation to the *TERT* ATG translation start site.



Supplementary Figure S2 - Bar plot indicating the number of cases with *TERT* mutations in *BRAF*-mutated and *BRAF*-wild-type conventional papillary thyroid carcinomas (cPTC) and melanomas. For both tumour types, the presence of *TERT* mutations is significantly associated with the presence of *BRAF* mutations (asterisks, Fisher's exact test two-sided).

Supplementary Table S1 - Genetic alterations in thyroid and melanoma cell lines

Origin	Cell line	<i>BRAF</i>	<i>RAS</i>	<i>RET</i>	<i>GNAQ</i>	<i>TERT</i>
Thyroid						
	XTC-1	WT	WT	ND	-	WT
	HTH74	V600E	WT	ND	-	-124G>A
	K1	V600E	WT	ND	-	-124G>A
	BCPAP	V600E	WT	ND	-	-124/-125GG>AA
	C643	WT	HRASG13E	ND	-	-124G>A
	8505C	V600E	WT	ND	-	-146G>A
	TPC-1	WT	WT	RET/PTC1	-	-124G>A
	T238					WT
	TT			C634W		WT
	MZ-CRC-1			M918T		WT
Skin melanoma						
	A375	V600E	WT		WT	-146G>A
	BLM	WT	WT		WT	-146G>A
	G361	V600E	WT		WT	-138/-139GG>AA
	Mewo	WT	WT		WT	-146G>A
Uveal melanoma						
	92.1	WT	WT		Q209L	WT
	OMM1	WT	WT		WT	WT
	OMM2.3	WT	WT		Q209L	WT
	Mel 202	WT	WT		Q209L	WT
	Mel 270	WT	WT		Q209P	WT
	Mel 285	WT	WT		WT	WT

*All the cell lines are deposited in the cell line bank from the IPATIMUP and were authenticated using DNA profile analysis, obtained with the PowerPlex 16 system (Promega, Madison, USA), according to ATCC and HSRRB available DNA profiles.

Supplementary Table S2 - Genetic alterations in cell lines

Origin	Derivation	Cell line	TERT
Colorectal	Colon adenocarcinoma	COLO-205	WT
	Colon adenocarcinoma	Caco-2	WT
	Colon adenocarcinoma	SW 480	WT
	Colon adenocarcinoma	HT29	WT
	Colon adenocarcinoma	HCT-15	WT
	Colon adenocarcinoma	HCT-116	WT
	Colon adenocarcinoma	SW48	WT
	Colon adenocarcinoma	Co-115	WT
Gastric	Gastric adenocarcinoma	AGS	WT
	Gastric adenocarcinoma	MKN28	WT
	Well-differentiated gastric carcinoma	NCI-N87	WT
	Poorly-differentiated gastric carcinoma	SNU-638	WT
	Poorly-differentiated gastric carcinoma	MKN-45	WT
	Poorly-differentiated gastric carcinoma	KATO III	WT
	Metastasis		
	Diffuse Gastric Carcinoma	IPA220A	WT
Diffuse Gastric Carcinoma	GP202	WT	
Breast	Breast adenocarcinoma	MDA-MB-231	-124G>A
	Breast adenocarcinoma	MCF-7AZ	WT
	Breast adenocarcinoma	SKBR3	WT
	Breast adenocarcinoma	MCF-7/6	WT
	Breast adenocarcinoma	BT-549	-146G>A
	Breast adenocarcinoma	BT-20	WT
	Breast adenocarcinoma	MDA-MB-468	WT
	Breast adenocarcinoma	SUM149	WT
Kidney	CCRCC	Caki-2	-124G>A
	CCRCC	786-O	-124G>A
Leukemia	Acute promyelocytic leukemia	NB-4	WT
	Acute promyelocytic leukemia	HL-60	WT
Peripheral B Lymphocytes	Lymphoblastoid cell lines	GM20770	WT
	Lymphoblastoid cell lines	GM20890	WT
	Lymphoblastoid cell lines	GM11840	WT
	Lymphoblastoid cell lines	GM19782 B	WT
	Lymphoblastoid cell lines	GM20515	WT
	Lymphoblastoid cell lines	GM19777	WT
	Lymphoblastoid cell lines	GM20797	WT
	Lymphoblastoid cell lines	GM10847 B	WT
Lung	Lung Adenocarcinoma	A549	WT
CNS	Glioblastoma	SF-767	WT

*All the cell lines are deposited in the cell line bank from the IPATIMUP and were authenticated using DNA profile analysis, obtained with the PowerPlex 16 system (Promega, Madison, USA), according to ATCC and HSRRB available DNA profiles.

Supplementary Table S3 – Summary of clinico-pathological and genetic data in 56 skin melanoma

Case Code	Melanoma subtype	Age	Gender	Thickness (mm)	BRAF	NRAS	TERT
MEL1	Superficial spreading	74	M	1.20		Pos	
MEL2	Superficial spreading	36	F	0.95			
MEL3	Superficial spreading	NA	F	0.50	V600E		
MEL4	Superficial spreading	NA	M	1.40			-146 G>A
MEL5	Superficial spreading	46	F	3.10			
MEL6	Nodular	52	F	0.90			
MEL7	Nodular	59	M	3.20	V600E		
MEL8	Lentigo maligna	67	F	0.50	V600E		
MEL9	Nodular	54	F	16.00			
MEL10	Nodular	33	M	19.50	V600E		
MEL11	Superficial spreading	57	F	3.65			-146 G>A
MEL12	Lentigo maligna	79	F	0	V600E		-146 G>A
MEL13	Acral lentiginous	94	F	2.10			
MEL14	Acral lentiginous	50	F	1.00			
MEL15	Superficial spreading	49	M	10.00		Pos	-124 G>A
MEL16	Superficial spreading	55	M	2.30			
MEL17	Nodular	82	F	3.50	V600E		
MEL18	Nodular	35	F	2.50	V600E		-124 G>A
MEL19	Superficial spreading	58	M	7.70			
MEL20	Nodular	42	F	1.70	V600E		-124 G>A
MEL21	Nodular	61	F	4.40			-124 G>A
MEL22	Acral lentiginous	69	M	4.00			
MEL23	Superficial spreading	41	M	0	V600E		
MEL24	Acral lentiginous	72	F	0.70			
MEL25	Superficial spreading	.	M	0.50			
MEL26	Nodular	76	M	6.00			
MEL27	Superficial spreading	66	M	0			-124 G>A
MEL28	Superficial spreading	55	F	1.78			
MEL29	Acral lentiginous	67	F	4.00			
MEL30	Nodular	63	M	5.00			
MEL31	Acral lentiginous	60	M	5.40	V600E	Pos	-124 G>A
MEL32	Superficial spreading	NA	M	0.50	V600E		-146 G>A
MEL33	Acral lentiginous	71	M	5.20			
MEL34	Superficial spreading	75	F	70.00	V600E		-124 G>A
MEL35	Nodular	69	F	7.00	V600E		-146 G>A
MEL36	Acral lentiginous	9	F	3.25			
MEL37	Superficial spreading	39	F	2.30			
MEL38	Acral lentiginous	68	M	4.50			
MEL39	Acral lentiginous	NA	M	2.70			
MEL40	Superficial spreading	NA	F	1.20	V600E		-146 G>A
MEL41	Superficial spreading	59	F	3.30	V600E		
MEL42	Acral lentiginous	NA	F	4.00			
MEL43	Lentigo maligna	NA	M	5.90		Pos	

MEL44	Lentigo maligna	NA	F	0.50			
MEL45	Acral lentiginous	68	F	2.20	V600E		
MEL46	Nodular	71	F	7.80			
MEL47	Superficial spreading	59	M	1.20			
MEL48	Superficial spreading	NA	M	0.35			
MEL49	Melanoma nodular	42	M	20.00	V600E		-124 G>A
MEL50	Superficial spreading	61	F	4.30	V600E		
MEL51	Nodular	79	M	22.00		Pos	-146 G>A
MEL52	Lentigo maligna	61	F	3.40			
MEL53	Acral lentiginous	75	M	6.10			
MEL54	Superficial spreading	49	F	2.90	V600E		-146 G>A
MEL55	Acral lentiginous	NA	M	4.40			
MEL56	Lentigo maligna	75	M	0.30			

Supplementary Table S4 - Summary of clinico-pathological and genetic data in 118 gliomas

Case Code	Age	Gender	Diagnosis (Grade)	TERT
GLI1	4	F	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI2	27	M	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI3	22	M	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI4	31	F	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI5	27	M	Pilocytic Astrocytoma (I)	-124 G>A
GLI6	18	M	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI7	30	F	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI8	12	F	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI9	NA	NA	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI10	NA	NA	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI11	NA	NA	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI12	NA	NA	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI13	NA	NA	Pilocytic Astrocytoma (I)	
GLI14	18	F	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI15	NA	NA	Diffuse Astrocytoma (II)	-124 G>A
GLI16	38	M	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI17	22	M	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI18	50	M	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI19	31	F	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI20	30	M	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI21	59	M	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI22	NA	NA	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI23	53	F	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI24	20	M	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI25	69	M	Diffuse Astrocytoma (II)	-146 G>A
GLI26	42	F	Diffuse Astrocytoma (II)	

GLI27	27	F	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI28	60	F	Diffuse Astrocytoma (II)	-124 G>A
GLI29	NA	NA	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI30	NA	NA	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI31	NA	NA	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI32	NA	NA	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI33	NA	NA	Diffuse Astrocytoma (II)	
GLI34	72	F	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI35	9	M	Oligodendroglioma (II)	
GLI36	33	M	Oligodendroglioma (II)	
GLI37	42	F	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI38	46	F	Oligodendroglioma (II)	
GLI39	45	F	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI40	43	M	Oligodendroglioma (II)	
GLI41	53	M	Oligodendroglioma (II)	-146 G>A
GLI42	53	F	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI43	54	F	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI44	43	F	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI45	34	M	Oligodendroglioma (II)	-146 G>A
GLI46	40	M	Oligodendroglioma (II)	
GLI47	45	F	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI48	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	
GLI49	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	
GLI50	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	
GLI51	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	
GLI52	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	
GLI53	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	
GLI54	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	
GLI55	NA	NA	Oligodendroglioma (II)	-124 G>A
GLI56	65	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI57	47	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI58	65	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI59	50	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-146 G>A
GLI60	36	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI61	53	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-146 G>A
GLI62	65	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-146 G>A
GLI63	47	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI64	50	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI65	70	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI66	40	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI67	67	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI68	64	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-146 G>A
GLI69	44	M	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI70	42	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI71	68	F	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI72	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	

GLI73	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI74	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI75	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	-124 G>A
GLI76	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI77	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI78	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI79	NA	NA	Anaplastic Oligodendroglioma (III)	
GLI80	56	M	Glioblastoma (IV)	-146 G>A
GLI81	27	F	Glioblastoma (IV)	
GLI82	54	F	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI83	46	F	Glioblastoma (IV)	
GLI84	77	M	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI85	67	F	Glioblastoma (IV)	-146 G>A
GLI86	50	F	Glioblastoma (IV)	-146 G>A
GLI87	73	M	Glioblastoma (IV)	-146 G>A
GLI88	57	M	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI89	28	M	Glioblastoma (IV)	
GLI90	51	F	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI91	69	M	Glioblastoma (IV)	-146 G>A
GLI92	53	M	Glioblastoma (IV)	
GLI93	56	F	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI94	66	M	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI95	68	F	Glioblastoma (IV)	
GLI96	58	F	Glioblastoma (IV)	
GLI97	73	M	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI98	61	F	Glioblastoma (IV)	
GLI99	66	F	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI100	60	F	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI101	54	M	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI102	66	F	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI103	79	M	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI104	31	M	Glioblastoma (IV)	
GLI105	NA	NA	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI106	NA	NA	Glioblastoma (IV)	
GLI107	NA	NA	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI108	NA	NA	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI109	NA	NA	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI110	NA	NA	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI111	NA	NA	Glioblastoma (IV)	
GLI112	NA	NA	Glioblastoma (IV)	
GLI113	NA	NA	Glioblastoma (IV)	-124 G>A
GLI114	NA	NA	Glioblastoma (IV)	
GLI115	NA	NA	Glioblastoma (IV)	-146 G>A
GLI116	NA	NA	Glioblastoma (IV)	
GLI117	NA	NA	Glioblastoma (IV)	
GLI118	NA	NA	Glioblastoma (IV)	

Supplementary Table S5 – Comparison of the clinico-pathological features of tumours with and without *TERT* mutations

Tumour type	Clinical features	All patients	<i>TERT</i> wild type	<i>TERT</i> mutated	<i>p</i> value
Thyroid* (n=263)	Mean age at diagnosis, yr (±SD)	48±17	46±16	62±13	<0,0001
	Gender				0,03
	Male	61 (24%)	50 (22%)	11(42%)	
	Female	189 (76%)	174 (78%)	15 (58%)	
	Mean tumour size, cm	3.5±3.4	3.4±3.4	4.6±2.7	0,008
CNS (n=118)	Mean age at diagnosis, yr (±SD)	47±18	38±17	57±12	<0,0001
	Gender				NS
	Male	42 (49%)	21 (51%)	20 (47%)	
	Female	43 (51%)	20 (49%)	23 (53%)	
Skin melanoma (n=56)	Mean age at diagnosis, yr (±SD)	60±16	60±14	63±12	NS
	Gender				NS
	Male	26 (46%)	19 (48%)	7 (44%)	
	Female	30 (54%)	21 (52%)	9 (56%)	
Bladder (n=82)	Mean age at diagnosis, yr (±SD)	63±10	65±12	63±12	NS
	Gender				NS
	Male	66 (80%)	24 (70%)	42 (88%)	
	Female	16 (20%)	10 (30%)	6 (12%)	

The numbers in parentheses indicate percentages. In some cases information regarding age, gender or tumour size was missing.

*Only follicular cell-derived thyroid carcinomas: FTC, PTC, PDTC and ATC.

Supplementary Table S6 – Clinico-pathological characteristics and *TERT* promoter mutation in the 399 thyroid samples analysed

Histotypes	No. Of cases	Gender ratio (♀:♂)	Mean age (years±SE)	Tumour size (cm±SE)	<i>BRAFV600E</i> mutation	<i>TERT</i> n (%)
Normal Thyroid	27	3,5:1	47,0 ± 14,8	NA	0	0 (0,0)
Lymphocytic Thyroiditis	9	9:0	44,6 ± 15,7	NA	0	0 (0,0)
Nodular Goiter	12	1,75:1	56,2 ± 13,4	NA	0	0 (0,0)
Follicular Thyroid Adenoma						
Conventional	52	7:1	43,8 ± 12,1	3,5 ± 1,6	0	0 (0,0)
Oncocytic Variant	8	7:0	47,0 ± 14,0	2,7 ± 1,2	0	0 (0,0)
Follicular Thyroid Carcinoma						
Conventional	36	2,5:1	53,7 ± 14,7	4,5 ± 2,8	0	9 (25,0)
Oncocytic Variant	28	5,5:1	51,4 ± 20,2	4,6 ± 3,6	0	0 (0,0)
Papillary thyroid carcinoma						
Conventional	110	3,1:1	43,1 ± 16,2	2,6 ± 1,6	61	12 (10,9)
Follicular Variant	39	3,9:1	45,8 ± 14,7	2,6 ± 1,2	2	0 (0,0)
Microcarcinoma	5	5:0	46,0 ± 14,4	0,4 ± 0,4	1	0 (0,0)
Mucoepidermoid Carcinoma	4	2:0	43,5 ± 33,2	NA	0	1 (25,0)
Oncocytic Variant of PTC						
Conventional Pattern	4	4:0	45,3 ± 11,1	2,8 ± 1,8	4	0 (0,0)
Follicular Pattern	3	2:1	45,3 ± 22,5	5,2 ± 3,9	1	0 (0,0)
Warthin-like PTC	4	4:0	55,5 ± 11,2	2,0 ± 0,8	4	0 (0,0)
PDTC	14	1:1	57,0 ± 17,4	6,7 ± 2,8	1	2 (14,2)
Anaplastic	16	1,3:1	62,1 ± 12,8	6,9 ± 3,1	5	2 (12,5)
MTC	28	2,3:1	46,4 ± 16,7	3,0 ± 0,9	0	0 (0,0)

Supplementary Table S7 - Summary of clinico-pathological and genetic data in 351 tumour and tumour like thyroid lesions

Case Code	Age	Gender	Diagnosis	RAS	BRAF	TERT
THY1	50	F	FTA			
THY2	50	F	FTA			
THY3	59	M	FTA			
THY4	28	F	FTA			
THY5	45	F	FTA			
THY6	51	F	FTA			
THY7	37	F	FTA			
THY8	53	F	FTA			
THY9	57	F	FTA			
THY10	66	F	FTA			
THY11	63	F	FTA			
THY12	40	F	FTA			
THY13	34	F	FTA			
THY14	65	F	FTA			
THY15	35	F	FTA			
THY16	34	F	FTA			
THY17	18	F	FTA			
THY18	37	F	FTA			
THY19	43	F	FTA			
THY20	53	F	FTA			
THY21	45	F	FTA			
THY22	33	F	FTA			
THY23	34	F	FTA			
THY24	46	M	FTA			
THY25	53	F	FTA			
THY26	65	F	FTA			
THY27	29	F	FTA			
THY28	34	F	FTA			
THY29	34	F	FTA			
THY30	NA	NA	FTA			
THY31	NA	NA	FTA			
THY32	56	F	FTA			
THY33	33	F	FTA			
THY34	47	M	FTA			
THY35	30	F	FTA			
THY36	55	M	FTA			
THY37	NA	F	FTA			

THY38	41	F	FTA			
THY39	45	F	FTA			
THY40	44	F	FTA			
THY41	NA	NA	FTA			
THY42	64	F	FTA			
THY43	NA	NA	FTA			
THY44	61	F	FTA			
THY45	45	F	FTA			
THY46	46	F	FTA			
THY47	29	M	FTA			
THY48	40	F	FTA			
THY49	35	M	FTA			
THY50	42	F	FTA			
THY51	35	F	FTA			
THY52	21	F	FTA			
THY53	36	F	FHCA			
THY54	NA	NA	FHCA			
THY55	25	F	FHCA			
THY56	62	F	FHCA			
THY57	38	F	FHCA			
THY58	57	F	FHCA			
THY59	52	F	FHCA			
THY60	59	F	FHCA			
THY61	54	F	cPTC			
THY62	39	F	cPTC		V600E	
THY63	48	M	cPTC	Pos		
THY64	28	F	cPTC		V600E	
THY65	49	F	cPTC		V600E	
THY66	38	F	cPTC			
THY67	24	F	cPTC		V600E	
THY68	76	F	cPTC		V600E	
THY69	55	F	cPTC			
THY70	28	F	cPTC			
THY71	36	F	cPTC		V600E	
THY72	69	F	cPTC		V600E	
THY73	68	F	cPTC			
THY74	55	F	cPTC		V600E	
THY75	30	F	cPTC	Pos		
THY76	47	F	cPTC		V600E	
THY77	32	F	cPTC	Pos		
THY78	25	F	cPTC		V600E	
THY79	55	F	cPTC			
THY80	31	F	cPTC		V600E	
THY81	64	F	cPTC		V600E	
THY82	30	F	cPTC			

THY83	55	F	cPTC			
THY84	56	F	cPTC			
THY85	25	F	cPTC			
THY86	28	F	cPTC		V600E	
THY87	18	F	cPTC			
THY88	56	F	cPTC			
THY89	14	M	cPTC			
THY90	57	F	cPTC		V600E	
THY91	40	F	cPTC			
THY92	53	M	cPTC		V600E	-124 G>A
THY93	61	F	cPTC			
THY94	44	M	cPTC		V600E	
THY95	82	M	cPTC		V600E	-124 G>A
THY96	42	M	cPTC		V600E	-124 G>A
THY97	46	F	cPTC			
THY98	46	M	cPTC		V600E	
THY99	39	M	cPTC		V600E	
THY100	79	F	cPTC		V600E	-124 G>A
THY101	32	F	cPTC			
THY102	37	F	cPTC		V600E	
THY103	72	F	cPTC		V600E	-124 G>A
THY104	77	M	cPTC		V600E	-124 G>A
THY105	60	M	cPTC		V600E	
THY106	15	M	cPTC			
THY107	38	F	cPTC		V600E	
THY108	38	M	cPTC		V600E	
THY109	38	M	cPTC		V600E	
THY110	27	F	cPTC			
THY111	40	F	cPTC		V600E	
THY112	66	M	cPTC		V600E	-124 G>A
THY113	57	F	cPTC		V600E	
THY114	50	F	cPTC		V600E	
THY115	13	F	cPTC			
THY116	37	F	cPTC		V600E	
THY117	26	F	cPTC		V600E	
THY118	30	F	cPTC			
THY119	52	F	cPTC		V600E	
THY120	42	F	cPTC		V600E	
THY121	NA	NA	cPTC			
THY122	73	F	cPTC			
THY123	54	F	cPTC			
THY124	16	M	cPTC			
THY125	47	F	cPTC		V600E	
THY126	55	F	cPTC		V600E	
THY127	31	F	cPTC	Pos		

THY128	52	F	cPTC			
THY129	25	F	cPTC			
THY130	39	F	cPTC		V600E	
THY131	41	M	cPTC		V600E	
THY132	36	F	cPTC		V600E	
THY133	35	F	cPTC			
THY134	63	F	cPTC		V600E	
THY135	NA	NA	cPTC			
THY136	26	F	cPTC			
THY137	31	F	cPTC			
THY138	30	M	cPTC			
THY139	58	F	cPTC		V600E	-124 G>A
THY140	40	F	cPTC			
THY141	45	M	cPTC		V600E	
THY142	43	M	cPTC		V600E	-124 G>A
THY143	67	M	cPTC		V600E	
THY144	30	F	cPTC			
THY145	31	F	cPTC			
THY146	33	F	cPTC		V600E	
THY147	44	F	cPTC		V600E	
THY148	NA	NA	cPTC			
THY149	61	F	cPTC		V600E	-124 G>A
THY150	54	F	cPTC		V600E	
THY151	72	M	cPTC		V600E	-124 G>A
THY152	52	F	cPTC		V600E	
THY153	20	M	cPTC			
THY154	NA	NA	cPTC			
THY155	47	M	cPTC		V600E	-146 G>A
THY156	36	F	cPTC			
THY157	59	M	cPTC			
THY158	33	F	cPTC			
THY159	30	F	cPTC		V600E	
THY160	29	M	cPTC			
THY161	40	F	cPTC		V600E	
THY162	27	F	cPTC		V600E	
THY163	64	F	cPTC		V600E	
THY164	43	F	cPTC			
THY165	25	F	cPTC			
THY166	42	F	cPTC		V600E	
THY167	53	F	cPTC		V600E	
THY168	22	F	cPTC		V600E	-150 G>A
THY169	41	F	cPTC		V600E	
THY170	7	M	cPTC			
THY171	39	F	fVPTC	Pos		
THY172	46	F	fVPTC			

THY173	36	M	fVPTC	Pos		
THY174	68	F	fVPTC			
THY175	56	F	fVPTC	Pos		
THY176	44	F	fVPTC			
THY177	21	M	fVPTC			
THY178	30	F	fVPTC	Pos		
THY179	61	M	fVPTC			
THY180	41	M	fVPTC	Pos		
THY181	38	F	fVPTC	Pos		
THY182	52	F	fVPTC			
THY183	33	F	fVPTC			
THY184	57	M	fVPTC			
THY185	40	F	fVPTC		V600E	
THY186	75	F	fVPTC			
THY187	47	F	fVPTC			
THY188	57	F	fVPTC			
THY189	57	F	fVPTC			
THY190	22	F	fVPTC		V600E	
THY191	67	F	fVPTC			
THY192	41	F	fVPTC			
THY193	25	F	fVPTC			
THY194	61	F	fVPTC	Pos		
THY195	42	F	fVPTC			
THY196	44	F	fVPTC			
THY197	40	F	fVPTC			
THY198	72	F	fVPTC			
THY199	60	M	fVPTC			
THY200	34	M	fVPTC		K601E	
THY201	38	F	fVPTC			
THY202	76	F	fVPTC			
THY203	36	F	fVPTC			
THY204	48	F	fVPTC			
THY205	30	F	fVPTC			
THY206	53	F	fVPTC			
THY207	38	F	fVPTC			
THY208	21	F	fVPTC			
THY209	42	M	fVPTC			
THY210	30	F	mPTC			
THY211	64	F	mPTC		V600E	
THY212	35	F	mPTC			
THY213	44	F	mPTC			
THY214	57	F	mPTC			
THY215	20	F	MEC			
THY216	67	F	MEC			-124 G>A
THY217	NA	NA	MEC			

THY218	NA	NA	MEC			
THY219	45	F	hcPTC		V600E	
THY220	43	F	hcPTC		V600E	
THY221	33	F	hcPTC		V600E	
THY222	60	F	hcPTC		V600E	
THY223	45	F	hcfvPTC			
THY224	68	F	hcfvPTC		V600E	
THY225	23	M	hcfvPTC			
THY226	68	F	wPTC		V600E	
THY227	55	F	wPTC		V600E	
THY228	41	F	wPTC		V600E	
THY229	58	F	wPTC		V600E	
THY230	55	M	FTC	Pos		
THY231	53	F	FTC			
THY232	82	F	FTC			-124 G>A
THY233	56	F	FTC			
THY234	54	F	FTC	Pos		
THY235	42	F	FTC			
THY236	85	M	FTC			
THY237	78	M	FTC	Pos		-124 G>A
THY238	66	M	FTC	Pos		
THY239	59	F	FTC	Pos		-124 G>A
THY240	41	F	FTC			
THY241	72	M	FTC			
THY242	45	M	FTC			
THY243	51	F	FTC			
THY244	24	M	FTC			
THY245	33	F	FTC			
THY246	42	F	FTC			
THY247	60	F	FTC			-124 G>A
THY248	76	F	FTC			-146 G>A
THY249	27	F	FTC	Pos		
THY250	38	M	FTC			
THY251	49	F	FTC	Pos		-124 G>A
THY252	34	F	FTC			
THY253	53	F	FTC			
THY254	60	F	FTC			
THY255	56	F	FTC			
THY256	56	F	FTC			
THY257	45	F	FTC			-146 G>A
THY258	36	F	FTC			
THY259	NA	NA	FTC			
THY260	64	M	FTC	Pos		
THY261	67	M	FTC			
THY262	58	F	FTC	Pos		-124 G>A

THY263	58	F	FTC	Pos		-124 G>A
THY264	52	F	FTC			
THY265	54	F	FTC	Pos		
THY266	57	F	FHCC			
THY267	55	F	FHCC			
THY268	56	F	FHCC			
THY269	70	F	FHCC			
THY270	NA	NA	FHCC			
THY271	19	F	FHCC	Pos		
THY272	24	F	FHCC			
THY273	59	F	FHCC			
THY274	78	F	FHCC			
THY275	43	F	FHCC			
THY276	63	F	FHCC			
THY277	26	F	FHCC			
THY278	26	F	FHCC			
THY279	NA	NA	FHCC			
THY280	86	F	FHCC			
THY281	53	F	FHCC			
THY282	41	M	FHCC			
THY283	29	M	FHCC			
THY284	68	F	FHCC			
THY285	77	F	FHCC			
THY286	69	F	FHCC			
THY287	41	M	FHCC			
THY288	35	F	FHCC			
THY289	59	F	FHCC			
THY290	57	F	FHCC			
THY291	23	F	FHCC	Pos		
THY292	36	M	FHCC	Pos		
THY293	86	F	FHCC			
THY294	63	F	PDTC			
THY295	NA	NA	PDTC			
THY296	58	M	PDTC		V600E	
THY297	68	F	PDTC			
THY298	NA	NA	PDTC			-124 G>A
THY299	71	F	PDTC			
THY300	52	F	PDTC			
THY301	70	M	PDTC			-124 G>A
THY302	64	M	PDTC			
THY303	38	M	PDTC			
THY304	80	M	PDTC			
THY305	11	M	PDTC			
THY306	52	F	PDTC			
THY307	54	F	PDTC	Pos		-146 G>A

THY308	60	M	Anaplastic		V600E	-124 G>A
THY309	72	M	Anaplastic			
THY310	NA	NA	Anaplastic		V600E	
THY311	74	F	Anaplastic		V600E	
THY312	52	F	Anaplastic			
THY313	55	M	Anaplastic			
THY314	NA	NA	Anaplastic			
THY315	NA	F	Anaplastic			
THY316	56	F	Anaplastic			
THY317	59	F	Anaplastic			
THY318	75	F	Anaplastic		V600E	
THY319	82	F	Anaplastic			
THY320	69	M	Anaplastic		V600E	
THY321	39	M	Anaplastic			
THY322	70	M	Anaplastic			
THY323	44	F	Anaplastic			-146 G>A
THY324	63	M	MTC			
THY325	NA	NA	MTC			
THY326	NA	NA	MTC			
THY327	32	F	MTC			
THY328	NA	NA	MTC			
THY329	NA	NA	MTC			
THY330	NA	NA	MTC			
THY331	NA	NA	MTC			
THY332	NA	NA	MTC			
THY333	NA	NA	MTC			
THY334	68	F	MTC			
THY335	NA	NA	MTC			
THY336	37	F	MTC			
THY337	NA	NA	MTC			
THY338	71	F	MTC			
THY339	40	M	MTC			
THY340	NA	NA	MTC			
THY341	56	F	MTC			
THY342	NA	NA	MTC			
THY343	38	F	MTC			
THY344	NA	NA	MTC			
THY345	NA	NA	MTC			
THY346	23	M	MTC			
THY347	NA	NA	MTC			
THY348	36	F	MTC			
THY349	NA	NA	MTC			
THY350	NA	NA	MTC			
THY351	NA	NA	MTC			

Supplementary Table S8 – Comparison of the clinico-pathological features of conventional PTC with and without *TERT* mutations

Tumour type	Clinical features	All patients	<i>TERT</i> wild type	<i>TERT</i> mutated	<i>p</i> value
Conventional Papillary Thyroid Carcinoma (n=110)	Mean age at diagnosis, yr (\pm SD)	43 \pm 16	41 \pm 15	63 \pm 14	<0,0001
	Gender				
	Male	26 (25%)	18 (19%)	8 (67%)	0,0012
	Female	80 (75%)	76 (81%)	4 (33%)	
	Mean tumour size, cm	2,6 \pm 1,6	2,4 \pm 1,4	4,3 \pm 2,2	0,0004
	LN metastasis (positive/total)	67 (73%)	56 (68%)	11 (100%)	0,03
	BRAF mutation (positive/total)	61 (57%)	49 (50%)	12 (100%)	0,001
NRAS mutation (positive/total)	4(7%)	4 (10%)	0 (0%)	NS	

Supplementary Table S9 - Summary of clinico-pathological and genetic data in 82 bladder cancers

Case Code	Age	Gender	Stage	Grade	<i>TERT</i>
BC1	66	M	Ta	Low Grade	-146 G>A
BC2	NA	M	T1	Low Grade	
BC3	80	M	Ta	Low Grade	-146 G>A
BC4	70	M	Ta	Low Grade	
BC5	67	M	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC6	80	M	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC7	65	M	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC8	40	M	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC9	36	M	T1	Low Grade	-124 G>A
BC10	64	M	Ta	Low Grade	
BC11	65	M	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC12	47	F	Ta	Low Grade	
BC13	54	M	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC14	41	M	T1	Low Grade	
BC15	50	M	T1	Low Grade	-124 G>A
BC16	67	M	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC17	97	M	Ta	Low Grade	-146 G>A
BC18	40	F	Ta	Low Grade	-124 G>A
BC19	60	M	Ta	Low Grade	
BC20	70	M	T1	Low Grade	-146 G>A
BC21	46	F	Ta	Low Grade	
BC22	61	F	Ta	High Grade	-146 G>A
BC23	NA	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC24	59	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC25	77	M	T1	High Grade	-146 G>A
BC26	65	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC27	83	F	T1	High Grade	-124 G>A
BC28	64	M	T1	High Grade	

BC29	NA	M	NA	High Grade	-124 G>A
BC30	NA	M	NA	High Grade	-146 G>A
BC31	67	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC32	NA	M	Ta	High Grade	
BC33	NA	M	T1	High Grade	
BC34	NA	M	T1	High Grade	
BC35	NA	M	T1	High Grade	-146 G>A
BC36	74	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC37	75	M	Ta	High Grade	
BC38	76	F	T1	High Grade	
BC39	45	M	Ta	High Grade	
BC40	NA	M	T1	High Grade	
BC41	76	F	T1	High Grade	
BC42	NA	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC43	72	F	Ta	High Grade	
BC44	NA	F	T1	High Grade	
BC45	67	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC46	NA	M	T1	High Grade	-146 G>A
BC47	NA	M	T1	High Grade	-146 G>A
BC48	51	M	T1	High Grade	-146 G>A
BC49	50	M	Ta	High Grade	-124 G>A
BC50	74	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC51	70	F	T1	High Grade	-124 G>A
BC52	50	M	T1	High Grade	-146 G>A
BC53	68	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC54	56	M	T1	High Grade	
BC55	53	M	T1	High Grade	
BC56	60	F	T1	High Grade	
BC57	74	M	T1	High Grade	
BC58	73	M	T1	High Grade	
BC59	60	F	T1	High Grade	

BC60	64	F	T1	High Grade	
BC61	74	M	T1	High Grade	
BC62	51	M	T1	High Grade	
BC63	63	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC64	57	M	Ta	High Grade	-146 G>A
BC65	67	F	Ta	High Grade	-146 G>A
BC66	58	M	Ta	High Grade	-124 G>A
BC67	66	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC68	64	M	T1	High Grade	
BC69	70	M	T1	High Grade	-146 G>A
BC70	68	M	Ta	High Grade	-146 G>A
BC71	64	M	T1	High Grade	
BC72	59	F	T1	High Grade	-124 G>A
BC73	63	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC74	66	M	Ta	High Grade	
BC75	76	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC76	71	M	T1	High Grade	
BC77	61	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC78	76	M	T1	High Grade	-124 G>A
BC79	61	M	T1	High Grade	
BC80	68	F	T1	High Grade	
BC81	72	M	T1	High Grade	
BC82	71	M	T1	High Grade	-146 G>A

Supplementary Table S10 - Summary of clinico-pathological and genetic data in 26 kidney cancers

Case code	Diagnosis	Age	Gender	Nuclear grade	Staging	TERT
RCC1	CCRCC	68	M			
RCC2	CCRCC	44	M			
RCC3	CCRCC	49	M			
RCC4	CCRCC	49	M	3	pT1a Nx Mx	
RCC5	CCRCC	57	M	2	pT1a Nx Mx	
RCC6	CCRCC	48	F	2	pT1a Nx Mx	
RCC7	CCRCC	48	F	2	pT1a Nx Mx	
RCC8	CCRCC	68	M	2	pT3a Nx Mx	
RCC9	CCRCC	50	M	4	pT3b Nx M0	
RCC10	CCRCC	50	M	4	pT3b Nx M1	
RCC11	CCRCC	62	M	3	pT2 Nx Mx	
RCC12	CCRCC	62	M	3	pT2 Nx Mx	
RCC13	CromRCC	59	M			
RCC14	CromRCC	77	F	2	pT2 Nx Mx	
RCC15	CromRCC	77	F	2	pT2 Nx Mx	
RCC16	CromRCC	72	M	4	pT2 Nx Mx	
RCC17	PRCC	NA	M			
RCC18	PRCC	61	M			
RCC19	PRCC	26	F	2	pT2 N2 MX	
RCC20	PRCC	78	M	2	pT1b Nx Mx	
RCC21	PRCC	34	M	1	pT1a Nx Mx	
RCC22	PRCC	60	M		pT1b Nx Mx	
RCC23	PRCC	60	M		pT1b Nx Mx	
RCC24	PRCC	71	M			
RCC25	PRCC	71	M			
RCC26	PRCC	75	M	3	pT1a Nx Mx	

CCRC – Clear cell renal carcinoma; CromRCC – chromophobe renal cell cancer; PRCC – Papillary renal cell carcinoma;

Supplementary Table S11 - Summary of clinico-pathological and genetic data in 17 pheochromocytoma

Case code	Age	Gender	Tumor size (cm)	<i>MEN/NF/VHL</i>	<i>TERT</i>
PHEO1	51	M	4,5	NA	
PHEO2	56	M	7	NA	
PHEO3	54	F	4	NA	
PHEO4	46	F	7	NA	
PHEO5	53	F	2,5	NA	
PHEO6	42	M	8,5	NA	
PHEO7	20	F	1,5	<i>MEN2</i>	
PHEO8	55	F	3,5	NA	
PHEO9	19	F	7	NA	
PHEO10	56	M	4,5	NA	
PHEO11	62	M	6	NA	
PHEO12	45	M	7	NA	
PHEO13	73	F	5	NA	
PHEO14	57	M	3,5	NA	
PHEO15	61	M	1,7	NA	
PHEO16	20	F	6	<i>MEN2</i>	
PHEO17	46	F	10	<i>NF1</i>	

Supplementary Table S12 - Summary of clinico-pathological and genetic data in 36 gastrointestinal stromal tumour

Case code	Age	Sex	Tumor Size (cm)	<i>KIT</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>TERT</i>
GIST1	80	F		exon 11 N567K, L576V, 568del575		
GIST2	59	M	1,2	exon 11 V560D		
GIST3	52	M	9,5	exon 11 69997:T>A		
GIST4	67	M	17	exon 11 W557F delK558		
GIST5	58	F	3,5	exon 11 556del557		
GIST6	54	M	19	exon 11 V559D		
GIST7	79	F	7	exon 11 del557-558		
GIST8	46	M	5,5	exon 11 del 550-557, ins550-551		
GIST9	54	M	3,1	exon 11 552del557, K550Q, P551R		
GIST10	76	F	6,7		exon 18 D842V	
GIST11	55	F	6,5	exon 11 del560V		
GIST12	43	M	14,5	exon 11 564del578		
GIST13	73	F	0,8	exon 11 delV559		
GIST14	62	M	2,5	exon 11 del_K558		
GIST15	38	M	3,5	exon 11 V560E		
GIST16	88	F	23	exon 11 L576P		
GIST17	81	F		exon 11 L576P		
GIST18	78	F			exon 12 583del586	
GIST19	40	F	4	exon 9 502-503dup		
GIST20	63	F	9	exon 9 502-503dup		
GIST21	75	M	8	exon 11 Q575H, P577T, delL576		
GIST22	59	F		exon 11 552del570		
GIST23	78	F	24	exon 11 551del553		
GIST24	58	M	13,5	exon 11 557del558		
GIST25	76	M	14	exon 9 502-503dup		
GIST26	20	F	2			
GIST27	77	F	6			
GIST28	74	M	3			
GIST29	58	F	3,5			
GIST30	72	F	8			
GIST31	62	M	6,5			
GIST32	73	M	6			
GIST33	66	F	14			
GIST34	63	F	6,5			
GIST35	55	M	4			
GIST36	82	F	7			

Artigo IV

- **Melo M***, da Rocha AG*, Vinagre J*, Batista R, Peixoto J, Tavares C, Celestino R, Almeida A, Salgado C, Eloy C, Castro P, Prazeres H, Lima J, Amaro T, Lobo C, Martins MJ, Moura M, Cavaco B, Leite V, Cameselle-Teijeiro JM, Carrilho F, Carvalheiro M, Máximo V, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 May; 99(5):E754-65. doi: 10.1210/jc.2013-3734. Epub 2014 Jan 29

* Autores com contribuição idêntica para o trabalho

TERT Promoter Mutations Are a Major Indicator of Poor Outcome in Differentiated Thyroid Carcinomas

Miguel Melo,* Adriana Gaspar da Rocha,* João Vinagre,* Rui Batista, Joana Peixoto, Catarina Tavares, Ricardo Celestino, Ana Almeida, Catarina Salgado, Catarina Eloy, Patrícia Castro, Hugo Prazeres, Jorge Lima, Teresina Amaro, Cláudia Lobo, Maria João Martins, Margarida Moura, Branca Cavaco, Valeriano Leite, José Manuel Cameselle-Teijeiro, Francisco Carrilho, Manuela Carnevalheiro, Valdemar Máximo, Manuel Sobrinho-Simões, and Paula Soares†

Context: Telomerase promoter mutations (*TERT*) were recently described in follicular cell-derived thyroid carcinomas (FCDTC) and seem to be more prevalent in aggressive cancers.

Objectives: We aimed to evaluate the frequency of *TERT* promoter mutations in thyroid lesions and to investigate the prognostic significance of such mutations in a large cohort of patients with differentiated thyroid carcinomas (DTCs).

Design: This was a retrospective observational study.

Setting and Patients: We studied 647 tumors and tumor-like lesions. A total of 469 patients with FCDTC treated and followed in five university hospitals were included. Mean follow-up (\pm SD) was 7.8 ± 5.8 years.

Main Outcome Measures: Predictive value of *TERT* promoter mutations for distant metastasization, disease persistence at the end of follow-up, and disease-specific mortality.

Results: *TERT* promoter mutations were found in 7.5% of papillary carcinomas (PTCs), 17.1% of follicular carcinomas, 29.0% of poorly differentiated carcinomas, and 33.3% of anaplastic thyroid carcinomas. Patients with *TERT*-mutated tumors were older ($P < .001$) and had larger tumors ($P = .002$). In DTCs, *TERT* promoter mutations were significantly associated with distant metastases ($P < .001$) and higher stage ($P < .001$). Patients with DTC harboring *TERT* promoter mutations were submitted to more radioiodine treatments ($P = .009$) with higher cumulative dose ($P = .004$) and to more treatment modalities ($P = .001$). At the end of follow-up, patients with *TERT*-mutated DTCs were more prone to have persistent disease ($P = .001$). *TERT* promoter mutations were significantly associated with disease-specific mortality [in the whole FCDTC ($P < .001$)] in DTCs ($P < .001$), PTCs ($P = .001$), and follicular carcinomas ($P < .001$). After adjusting for age at diagnosis and gender, the hazard ratio was 10.35 (95% confidence interval 2.01–53.24; $P = .005$) in DTC and 23.81 (95% confidence interval 1.36–415.76; $P = .03$) in PTCs.

Conclusions: *TERT* promoter mutations are an indicator of clinically aggressive tumors, being correlated with worse outcome and disease-specific mortality in DTC. *TERT* promoter mutations have an independent prognostic value in DTC and, notably, in PTC. (*J Clin Endocrinol Metab* 99: E754–E765, 2014)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.
Copyright © 2014 by the Endocrine Society
Received October 8, 2013. Accepted January 15, 2014.
First Published Online January 29, 2014

† Author affiliations are shown at the bottom of the next page.

* M. Me., A. G. d. R., and J. V. contributed equally to this work.

Abbreviations: AJCC, American Joint Committee on Cancer; ATC, anaplastic thyroid carcinoma; CI, confidence interval; DTC, differentiated thyroid carcinoma; FCDTC, follicular cell-derived thyroid carcinoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; HR, hazard ratio; OR, odds ratio; PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma; PTC, papillary thyroid carcinoma.

Telomerase activation is known to be a hallmark of cancer (1), being detected in up to 80% of malignant tumors (2, 3). Some tumors may maintain their telomeres by an alternative mechanism, which is telomerase independent, designated as alternative lengthening of telomeres, which appears to maintain telomeres through recombination-based interchromosomal exchange of sequence information (4, 5). The maintenance of telomere length in cancer cells is thought to result more frequently from telomerase reexpression than from alternative lengthening of telomeres, although the mechanisms underlying such process remain largely unknown.

Thyroid tissue is a conditionally renewing tissue, which proliferates rarely in adult life (6). We have proposed that the embryonic remnants of the ultimobranchial body, the so-called solid cell nests of the thyroid, may represent the pool of thyroid stem cells because they express several stem cell markers, including telomerase (7). At variance with this, normal thyroid tissue is thought to be telomerase negative, thus raising the possibility that the reactivation of telomerase may be a useful marker of tumor development (8).

Several studies have examined telomerase activity in thyroid lesions and surrounding normal tissues using a PCR-based telomeric repeat amplification protocol assay for detection of telomerase activity and RT-PCR or quantitative real-time RT-PCR for the detection of *TERT* mRNA (for a review see reference 9). Thyroid carcinomas apparently display less frequent telomerase activation than other human carcinomas. Approximately 66% of all the thyroid carcinomas analyzed to date display telomerase activation that is more frequent in undifferentiated thyroid carcinomas than in differentiated carcinomas (9). Putting together the results obtained in the evaluation of telomerase activity by several authors, telomerase activity/expression is reported in 48% of papillary thyroid carcinomas (PTCs) and 71% of follicular thyroid carcinomas (FTCs). *TERT* copy number gain was described in familial PTCs (10). Capezzone et al (11) observed telomerase activity in most sporadic and familial malignant thyroid tumors as well as in some adenomas. No telomerase activity was observed in hyperplastic nodules or in normal thyroid tissue of patients with sporadic PTCs (11). Altogether, the

forementioned findings suggest that telomerase activity may contribute to a more aggressive behavior of thyroid tumors (12–14).

Recently highly frequent mutations in the promoter region of *TERT* were reported in melanomas, gliomas, and bladder and thyroid cancers (15–18). These mutations occur in two hot spot positions, located –124 and –146 bp upstream from the ATG start site (–124G>A and –146G>A, C>T on the opposite strand) and confer enhanced *TERT* promoter activity (1, 2) putatively by generating a consensus binding site (GGAA) for *ETS* transcription factors within the *TERT* promoter region. In thyroid tumors, these mutations were shown to be associated with aggressive features and with the presence of *BRAF* or *BRAF/RAS* mutations (15, 19, 20). The role played by *TERT* promoter mutations in the clinical course of thyroid tumors, response to the therapy and survival of cancer patients, remains to be addressed.

In the present study, we searched for the presence of telomerase promoter mutations in a large series of thyroid tumors and investigated the putative clinical significance of such somatic alterations.

Materials and Methods

All the procedures described in this study were in accordance with national and institutional ethical standards. Patients signed an informed consent form approved by the internal reviewing board.

Patient tissue samples

Six hundred forty-seven formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from tumors and tumor-like lesions of the thyroid and from normal thyroid parenchyma localized at distance from the respective tumors were collected from the files of the Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (Porto, Portugal), corresponding to patients followed up in five university hospitals in Portugal and Spain. The histology of all tumor samples was revised by three pathologists (C.E., J.M.C.-T., M.S.-S.) according to the World Health Organization criteria (21). Data on the histological characteristics of the 647 samples and the frequency of *TERT* promoter mutations in each group are summarized in Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>. Twelve follicular adenomas

Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (M.Me., A.G.d.R., J.V., R.B., J.P., C.T., R.C., A.A., C.S., C.E., P.C., H.P., J.L., V.M., M.S.-S., P.S.), 4200-465 Porto, Portugal; Medical Faculty, University of Porto (A.G.d.R., C.T.), 4200-139 Porto, Portugal; Institute of Biomedical Sciences of Abel Salazar, University of Porto (J.V., A.A.), 4050-313 Porto, Portugal; Department of Pathology and Oncology, Medical Faculty, University of Porto (J.L., V.M., M.S.-S., P.S.), 4200-139 Porto, Portugal; Departments of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism (M.Me., F.C., M.C.) and Pathology (M.J.M.), University and Hospital Center of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal; Unit of Endocrinology (M.Me., M.C.), Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal; School of Allied Health Sciences, ESTSP – Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (R.C.), Polytechnic of Porto, 4400-330 Vila Nova de Gaia, Portugal; Portuguese Institute of Oncology (H.P.), Coimbra Center, 3000-075 Coimbra, Portugal; Department of Pathology (T.A.), Hospital Pedro Hispano, 4464-513 Matosinhos, Portugal; Department of Pathology (C.L.), Portuguese Institute of Oncology, Porto Center, 4200-072 Porto, Portugal; Center for Investigation of Molecular Pathology (M.Me., B.C., V.L.) and Department of Endocrinology (V.L.), Portuguese Institute of Oncology, Lisbon Center, 1099-023 Lisbon, Portugal; Center for the Study of Chronic Diseases (M.Me., B.C., V.L.), Faculty of Medical Sciences, University of Lisbon, 1099-085 Lisbon, Portugal; Department of Pathology (J.M.C.-T.), Clinical University Hospital, Servicio Gallego de Salud - SERGAS, Medical Faculty, University of Santiago de Compostela, 15705 Santiago de Compostela, Spain, and Department of Pathology (M.S.-S.), Hospital S. João, 4200-319 Porto, Portugal

and 27 PTCs from the Chernobyl-irradiated setting that we had previously studied (22) were also searched for the presence of *TERT* promoter mutations. Due to their etiopathogenic specificity (irradiation induced tumors) and lack of complete clinical information, they were not included in the subsequent clinicopathological analysis.

DNA extraction

DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues was retrieved from 10- μ m sections after careful microdissection. DNA extraction was performed using the Ultraprep tissue DNA kit (AHN Biotechnology) following the manufacturer's instructions.

PCR and Sanger sequencing

The genetic characterization of part of the tumors series regarding *BRAF*, *NRAS*, *RET/PTC*, and *PAX8/PPARG* had been previously reported; mutations were screened as previously described (23–25). To screen for *TERT* promoter mutations, we analyzed the hot spots previously identified by PCR followed by Sanger sequencing. *TERT* promoter mutation analysis was performed with the pair of primers forward *TERT*, CAGCGCTGCCTGAAACTC; and reverse *TERT*, GTCCTGCCCTT CACCTT. Amplification of genomic DNA (25–100 ng) was performed by PCR using the QIAGEN multiplex PCR kit following the manufacturer's instructions (further details on the amplification will be given upon request). Sequencing reaction was performed with the ABI Prism BigDye terminator kit (PerkinElmer), and the fragments were run in an ABI prism 3100 genetic analyzer (PerkinElmer). The sequencing reaction was performed in a forward direction, and all the detected mutations were further validated by a new independent analysis in both strands (Supplemental Figure 1).

Patients' follow-up

Patients were treated and followed up in accordance with international protocols available at the time. Data regarding the number of radioiodine treatments and cumulative activity were retrieved from hospital records, together with other therapeutic procedures. For statistical analysis, we defined the category, additional treatments, in which we included other treatment modalities in addition to radioiodine, including surgery, external beam irradiation, and treatment with tyrosine kinase inhibitors (Supplemental Table 2). Patients were defined as being disease free at the end of follow-up if they had undetectable stimulated thyroglobulin (in the absence of thyroglobulin antibodies) and no imagiological evidence of disease. In the survival analysis, we have considered only deaths attributable to the thyroid carcinoma (disease-specific mortality).

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with SPSS version 20.0 (SPSS Inc). The results are expressed as a percentage or mean \pm SD. Statistical analysis was performed both on the whole series of follicular cell-derived thyroid carcinomas (FCDTCs) and considering the different groups of tumors. A Fisher's exact test, *t* test (unpaired, two tailed), and ANOVA were used when appropriate. The predictive value of *TERT* promoter mutations and other factors [age, gender, histologic category, extrathyroidal extension, vascular invasion, lymph node metastases, staging I–IV (Union for International Cancer Control/American Joint Com-

mittee on Cancer [AJCC]), *BRAF* mutations, *RAS* mutations] for distant metastases and disease-free status at the end of follow-up were assessed using univariate and multivariate logistic regression models. Survival curves were plotted by the Kaplan-Meier method with the log-rank statistics. Multivariate survival analysis was performed using Cox regression. In the regression models, all the variables significantly associated with the specified outcome in the univariate model were included in the multivariate analysis. Mortality was expressed as a percentage and rate per person-year, the latter obtained dividing the number of thyroid cancer-specific deaths by the total follow-up time. Results were considered statistically significant at $P < .05$.

Results

TERT promoter mutations were not detected in normal parenchyma ($n = 30$) or in benign lesions ($n = 81$), such as a nodular goiter (hyperplastic lesions), lymphocytic thyroiditis, or follicular adenomas. *TERT* promoter mutations were also not detected in medullary thyroid carcinomas ($n = 28$) or in any of the 39 tumors from the Chernobyl series (Supplemental Table 1).

TERT promoter mutations were detected in 58 FCDTCs. The mutations were detected in 25 PTCs (7.5%), 12 FTCs (17.1%), nine poorly differentiated thyroid carcinomas (PDTCs; 29.0%), and 12 anaplastic thyroid carcinomas (ATCs; 33.3%) (Table 1). In differentiated thyroid carcinomas (DTCs), the overall prevalence of *TERT* promoter mutations was 9.2%. *TERT* promoter mutations were slightly more frequent in conventional PTCs (8.3%) than in cases of follicular variant of PTCs (6.8%). All PTCs and FTCs with oncocyte features as well as tall-cell PTCs and Warthin-like PTCs did not harbor *TERT* promoter mutations (Supplemental Table 1). Most of the mutated cases (48 of 58) presented the $-124G>A$ mutation and the remaining 10 cases presented the $-146G>A$.

Because *TERT* promoter mutations were only detected in FCDTCs, the subsequent clinicopathological analysis was restricted to these tumors (Table 1).

Relationship between *TERT* mutation and clinicopathological features

In the group of patients with DTCs, the presence of *TERT* promoter mutations was significantly associated with older age ($P < .001$) and larger tumor size ($P = .002$) (Table 2). Patients with tumors harboring *TERT* mutations had more distant metastases ($P < .001$) and higher stage ($P < .001$). No association was found with the presence of vascular invasion, extrathyroidal extension, or lymph node metastases.

A regression model was performed for factors associated with distant metastases in DTCs (Table 3). A total of

Table 1. Epidemiological, Histological, and Clinical Data of Patients With FCDTCs Included in the Study

	Total	PTC	FTC	PDTC	ATC
Total number	469	332	70	31	36
Age at diagnosis, y, n	469	332	70	31	36
Mean, y	48.2 ± 16.9	44.8 ± 15.6	51.8 ± 16.4	53.2 ± 18.4	68.7 ± 10.4
<45	211 (45.0)	178 (53.6)	23 (32.9)	8 (25.8)	2 (5.6)
≥45	258 (55.0)	154 (46.4)	47 (67.1)	23 (74.2)	34 (94.4)
Gender, n	459	327	68	29	35
Female	342 (74.5)	254 (77.7)	50 (73.5)	16 (55.2)	22 (62.9)
Male	117 (25.5)	73 (22.3)	18 (26.5)	13 (44.8)	13 (37.1)
Tumor size, cm, n	418	315	61	26	16
<2 ^a	151 (36.1)	142 (45.0)	7 (11.5)	2 (7.7)	0
2–4	161 (38.5)	129 (41.0)	23 (37.7)	7 (26.9)	2 (12.5)
>4	106 (25.4)	44 (14.0)	31 (50.8)	17 (65.4)	14 (87.5)
Extrathyroidal extension, n	373	268	49	20	36
Present	231 (61.9)	176 (65.7)	8 (16.3)	12 (60.0)	35 (97.2)
Vascular invasion, n	325	257	53	8	7
Present	157 (48.3)	103 (40.1)	39 (73.6)	8 (100.0)	7 (100.0)
Lymph node metastasis, n	391	298	47	24	22
Present	234 (59.8)	202 (67.8)	8 (17.0)	14 (58.3)	10 (45.5)
Distant metastasis, n	337	263	31	20	23
Present	76 (22.6)	36 (13.7)	8 (25.8)	14 (70.0)	18 (78.3)
Stage (sixth UICC/AJCC), n	310	225	29	20	36
I	134 (43.2)	124 (55.1)	8 (27.6)	2 (10.0)	0
II	36 (11.6)	25 (11.1)	8 (27.6)	3 (15.0)	0
III	45 (14.5)	36 (16.0)	5 (17.2)	4 (20.0)	0
IV	95 (30.7)	40 (17.8)	8 (27.6)	11 (55.0)	36 (100.0)
<i>TERT</i> promoter, n	469	332	70	31	36
Wild-type	411 (87.6)	307 (92.5)	58 (82.9)	22 (71.0)	24 (66.7)
Mutation	58 (12.4)	25 (7.5)	12 (17.1)	9 (29.0)	12 (33.3)

Abbreviations: n, number of patients with available data for each feature; UICC, Union for International Cancer Control. Numbers in parentheses represent percentages within each category.

^a Number of microcarcinomas (≤1.0 cm): total, 47 (11.2%); PTC, 43 (13.7%); FTC, 4 (6.6%); PDTC, 0; ATC, 0.

44 patients (15.0%) with DTCs had distant metastases detected during follow-up; the metastases were located in the lung (n = 28), bone (n = 8), lung and bone (n = 6), brain (n = 1), and lung and kidney (n = 1). *TERT* promoter mutations [odds ratio (OR) 5.36; $P < .001$], gender (OR 2.31; $P = .02$), tumor size (OR 1.28; $P = .009$), and vascular invasion (OR 3.94; $P < .001$) were associated with distant metastases. *TERT* promoter mutations were found to be a predictor of distant metastases irrespectively of gender and vascular invasion. When all the features associated with distant metastases in the univariate model were introduced in the multivariate regression, vascular invasion became the only independent predictive factor of distant metastases.

In patients with PTCs, the presence of *TERT* promoter mutations was associated with older age ($P < .001$), larger tumor size ($P = .005$), and higher stage ($P = .02$) (Table 2). Although patients with *TERT* mutation-positive PTCs had distant metastases more frequently than patients harboring *TERT* mutation-negative PTCs (27.8% vs 14.7%, respectively), the difference was not statistically significant ($P = .07$).

In patients with FTCs, the presence of *TERT* promoter mutations was associated with older age ($P = .004$), higher stage ($P = .007$), and distant metastases ($P < .001$).

In patients with PDTCs and ATCs, the presence of *TERT* promoter mutations was associated with older age ($P = .003$) and female gender ($P = .02$).

Taken *BRAF* and *RAS* together, 60.3% of *TERT*-mutated tumors were also mutated for *BRAF* or *RAS*. In PTCs, there was a significant association between the presence of *TERT* promoter mutations and the presence of *BRAF* mutation ($P = .008$) (Table 2). The *BRAF* mutation was not associated with increased lymph node or distant metastases or with patients' outcome (survival) (see Figure 2H). In patients with *TERT*-mutated tumors, the coexistence of *BRAF* mutations was not associated with more aggressive clinicopathological features or worse outcome (Supplemental Table 3 and Supplemental Figure 2). No associations were found concerning *RAS* mutated tumors.

None of the cases presenting *RET/PTC* (12 of 75) or *PAX8/PPARG* rearrangement (5 of 62) had *TERT* promoter mutations.

Relationship between *TERT* promoter mutations, clinicopathological features, and outcome

Mean follow-up time (±SD) of the patients was 7.8 ± 5.8 years (range 0.1–38.9 y). The total follow-up for the whole of FCDTC patients was 2967.5 person-years,

Table 2. Summary of Clinicopathological and Molecular Associations With *TERT* Promoter Mutations in Thyroid Cancers

Tumor Type	All Patients	<i>TERT</i> Wild Type	<i>TERT</i> Mutated	P Value
DTCs (n = 402)				
Clinicopathological				
Age at diagnosis, y (n = 402)	46.0 ± 16.0	44.5 ± 15.6	60.2 ± 12.7	<.001
Gender (n = 395)				
Female	304 (77.0)	278 (77.7)	26 (70.3)	NS (.31)
Male	91 (23.0)	80 (22.3)	11 (29.7)	
Mean tumor size, cm (n = 376)	2.7 ± 1.9	2.6 ± 1.8	3.6 ± 2.3	.002
Extrathyroidal extension (n = 317) ^a				
Present	184 (58.0)	167 (57.4)	17 (65.4)	NS (.43)
Vascular invasion (n = 310) ^b				
Present	142 (45.8)	129 (45.4)	13 (50.0)	NS (.65)
LN metastases (n = 345)				
Present	210 (60.9)	189 (61.0)	21 (60.0)	NS (.91)
Distant metastases (n = 294)				
Present	44 (15.0)	34 (12.5)	10 (43.5)	<.001
Stage (n = 254)				
I	132 (52.0)	129 (55.1)	3 (15.0)	<.001
II	33 (13.0)	31 (13.3)	2 (10.0)	
III	41 (16.1)	37 (15.8)	4 (20.0)	
IV	48 (18.9)	37 (15.8)	11 (55.0)	
Other genetic alterations				
<i>BRAF</i> mutation (n = 357)	148 (41.5)	130 (40.2)	18 (52.9)	NS (.15)
<i>NRAS</i> mutation (n = 365)	29 (7.9)	24 (7.3)	5 (14.3)	NS (.15)
PTCs (n = 332)				
Clinicopathological				
Age at diagnosis, y (n = 332)	44.8 ± 15.6	43.6 ± 15.3	58.4 ± 13.2	<.001
Gender (n = 327)				
Female	254 (77.7)	237 (78.5)	17 (68.0)	NS (.23)
Male	73 (22.3)	65 (21.5)	8 (32.0)	
Mean tumor size, cm (n = 315)	2.4 ± 1.5	2.3 ± 1.4	3.2 ± 2.2	.005
Extrathyroidal extension (n = 268) ^a				
Present	176 (65.7)	162 (64.8)	14 (77.8)	NS (.26)
Vascular invasion (n = 257) ^b				
Present	103 (40.1)	98 (40.7)	5 (31.3)	NS (.46)
LN metastases (n = 298)				
Present	202 (67.8)	184 (66.9)	18 (78.3)	NS (.26)
Distant metastases (n = 263)				
Present	36 (13.7)	31 (14.7)	5 (27.8)	NS (.07)
Stage (n = 225)				
I	124 (55.1)	121 (57.3)	3 (21.4)	.02
II	25 (11.1)	24 (11.4)	1 (7.1)	
III	36 (16.0)	32 (15.2)	4 (28.6)	
IV	40 (17.8)	34 (16.1)	6 (42.9)	
Other genetic alterations				
<i>BRAF</i> mutation (n = 301)	148 (49.2)	130 (46.9)	18 (75.0)	.008
<i>NRAS</i> mutation (n = 301)	15 (5.0)	14 (5.1)	1 (4.2)	NS (.85)
FTCs (n = 70)				
Clinicopathological				
Age at diagnosis, y (n = 70)	51.8 ± 16.4	49.3 ± 16.3	63.8 ± 11.0	.004
Gender (n = 68)				
Female	50 (73.5)	41 (73.2)	9 (75.0)	NS (.90)
Male	18 (26.5)	15 (26.8)	3 (25.0)	
Mean tumor size, cm (n = 61)	4.4 ± 2.6	4.4 ± 2.6	4.4 ± 2.5	NS (.96)
Extrathyroidal extension (n = 49) ^a				
Present	8 (16.3)	5 (12.2)	3 (37.5)	NS (.08)
Vascular invasion (n = 53) ^b				
Present	39 (73.6)	31 (72.1)	8 (80.0)	NS (.61)
LN metastases (n = 47)				
Present	8 (17.0)	5 (14.3)	3 (25.0)	NS (.39)

(Continued)

Table 2. Continued

Tumor Type	All Patients	<i>TERT</i> Wild Type	<i>TERT</i> Mutated	<i>P</i> Value
Distant metastases (n = 31)				
Present	8 (25.8)	3 (11.5)	5 (100.0)	<.001
Stage (n = 29)				
I	8 (27.6)	8 (34.8)	0	.007
II	8 (27.6)	7 (30.4)	1 (16.7)	
III	5 (17.2)	5 (21.7)	0	
IV	8 (27.6)	3 (13.1)	5 (83.3)	
Other genetic alterations				
<i>BRAF</i> mutation (n = 56)	0	0	0	^c
<i>NRAS</i> mutation (n = 64)	14 (21.9)	10 (18.9)	4 (36.4)	NS (0.20)
Undifferentiated thyroid carcinomas (poorly differentiated + anaplastic) (n = 67)				
Clinicopathological				
Age at diagnosis, y (n = 67)	61.5 ± 16.2	58.3 ± 17.6	68.7 ± 9.6	.003
Gender (n = 64)				
Female	38 (59.4)	22 (50.0)	16 (80.0)	.02
Male	26 (40.6)	22 (50.0)	4 (20.0)	
Mean tumor size, cm (n = 42)	6.5 ± 3.2	6.3 ± 3.4	6.8 ± 2.9	NS (.62)
Extrathyroidal extension (n = 56) ^a				
Present	47 (83.9)	32 (82.1)	15 (88.2)	NS (.56)
Vascular invasion (n = 15) ^b				
Present	15 (100.0)	11 (100.0)	4 (100.0)	^c
LN metastases (n = 46)				
Present	24 (52.2)	16 (57.1)	8 (44.4)	NS (.40)
Distant metastases (n = 43)				
Present	32 (74.4)	19 (70.4)	13 (81.3)	NS (.43)
Stage (n = 56)				
I	2 (3.6)	2 (5.3)	0	NS (.39)
II	3 (5.4)	3 (7.9)	0	
III	4 (7.1)	2 (5.3)	2 (11.1)	
IV	47 (83.9)	31 (81.5)	16 (88.9)	
Other genetic alterations				
<i>BRAF</i> mutation (n = 65)	10 (15.4)	6 (13.6)	4 (19.0)	NS (0.57)
<i>NRAS</i> mutation (n = 61)	17 (27.9)	9 (22.5)	8 (38.1)	NS (0.20)

Abbreviations: LN, lymph node; n, number of patients with available data for each feature; NS, not significant. Numbers in parentheses represent percentages within each category. Bold values indicate the result was statistically significant.

^a Extrathyroidal extension was defined as having disease extending beyond the thyroid capsule, including either microscopic or macroscopic invasion.

^b Vascular invasion was defined as the presence of intravascular tumor cells either covered by endothelium or associated with thrombus, affecting lymphatic or blood vessels within or beyond the tumor capsule.

^c No statistics were computed due to constant numbers of one feature.

2760.8 person-years for DTC patients, 2342.9 person-years for PTC patients, and 417.9 person-years for FTC patients.

Patients with *TERT* promoter-mutated DTCs were submitted to more radioiodine treatments (2.7 ± 1.8 vs 1.8 ± 1.2 ; $P = .009$) with higher cumulative doses (15.8 ± 12.4 vs 9.0 ± 8.1 GBq; $P = .004$) as well as to more treatment modalities of other types (2.6 ± 2.5 vs 1.1 ± 1.5 ; $P = .001$) (Supplemental Table 2). A similar analysis was not performed for PDTCs and ATCs due to the heterogeneity of the therapeutic management of these two groups of patients.

At the end of follow-up, patients with DTCs harboring *TERT*-mutated tumors were more prone to have persistent disease (OR 5.10; $P = .001$) (Table 3). Male gender (OR 2.10; $P = .04$) and lymph node metastases (OR 1.95;

$P = .04$) were other factors associated with disease persistence. In the multivariate model, *TERT* promoter mutations were independent predictors of persistent disease at the end of follow-up.

During follow-up, the overall disease-specific mortality was 11.7% in FCDTCs, 2.2% in DTCs, and 1.8% in the group of patients with PTCs (Table 4). The disease-specific mortality rate was 14.83 per 1000 person-years in FCDTCs, 2.53 per 1000 person-years in DTCs, and 2.13 per 1000 person-years in PTCs.

The Kaplan-Meier survival analysis showed that the presence of *TERT* promoter mutations was associated with increased disease-specific mortality in DTCs (log rank $P < .001$), PTCs (log rank $P = .001$), and FTCs (log rank $P < .001$) (Figure 1 and Table 4). Age at diagnosis and the pres-

Table 3. Predictive Factors for Distant Metastases and Disease Persistence at the End of Follow-Up in Differentiated Thyroid Carcinomas

	Distant Metastases (n = 294)					Persistent Disease (n = 211)				
	Presence (%)	Univariate Analysis		Multivariate Analysis		Presence (%)	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
		OR (95% CI)	P Value	OR (95% CI)	P Value		OR (95% CI)	P Value	OR (95% CI)	P Value
Total	44 (15.0)					58 (27.5)				
Age, y										
<45	17 (11.5)	1 (Referent)	NS			25 (22.9)	1 (Referent)	NS		
≥45	27 (18.5)	1.75 (0.91–3.37)	(.09)			33 (32.4)	1.61 (0.87–2.96)	(.13)		
Gender										
Female	28 (12.4)	1	.02	1	.03	42 (24.9)	1	.04	1	.03
Male	16 (24.6)	2.31 (1.16–4.60)		2.32 (1.10–4.90)		16 (41.0)	2.10 (1.02–4.35)		2.46 (1.11–5.47)	
Tumor size ^a			.009		.10					
Extrathyroidal extension										
No	14 (15.1)	1	NS			22 (24.4)	1	NS		
Yes	22 (14.3)	0.94 (0.46–1.94)	(.87)			28 (35.9)	1.73 (0.89–3.27)	(.11)		
Vascular invasion										
No	10 (7.2)	1	<.001	^b		16 (20.0)	1	NS		
Yes	22 (23.4)	3.94 (1.77–8.78)				22 (32.8)	1.96 (0.93–4.13)	(.08)		
Lymph node metastases										
ND/Nx	17 (17.9)	1	NS			21 (23.3)	1	.04	1	.03
N1	27 (15.7)	0.85 (0.44–1.66)	(.64)			35 (37.2)	1.95 (1.03–3.71)		2.16 (1.10–4.25)	
BRAF ^c										
wt	21 (17.2)	1	NS			20 (22.7)	1	NS		
V600E	14 (12.1)	0.66 (0.32–1.37)	(0.26)			26 (37.1)	2.00 (1.00–4.03)	(.05)		
TERT										
wt	34 (12.5)	1	<.001	1	.002	48 (24.6)	1	.001	1	.007
mut	10 (43.5)	5.36 (2.18–13.18)		4.60 (1.73–12.21)		10 (62.5)	5.10 (1.76–14.78)		4.68 (1.54–14.27)	

Abbreviations: mut, mutated; n, number of patients with available data for each feature; NS, not significant; wt, wild type. Bold values indicate the result was statistically significant.

^a Tumor size was included in the model as a continuous variable.

^b Vascular invasion was not considered in the multivariate model displayed in the table. The OR of TERT promoter mutations for distant metastases adjusted for gender was 5.61 (2.24–16.06) ($P = .001$); the OR of TERT promoter mutations adjusted for tumor size was 4.30 (1.66–11.13) ($P = .003$); the OR of TERT promoter mutations adjusted for vascular invasion was 3.54 (1.06–11.82) ($P = .04$); the OR of TERT promoter mutations adjusted for vascular invasion and gender was 3.51 (1.05–11.72) ($P = .04$). When all the features associated with distant metastases in the univariate model (gender, tumor size, TERT mutational status, and vascular invasion) were included in the multivariate model, vascular invasion was the only independent predictor of distant metastases, with an OR adjusted for age, tumor size, gender, and TERT of 3.38 (1.42–8.04).

^c BRAF analysis was performed only in the group of PTC.

ence of distant metastases were the other clinicopathological features significantly associated with patients' survival (Figure 2).

In the Cox regression analysis, the hazard ratio (HR) for mortality from DTC in patients harboring tumors with TERT promoter mutation was 19.42 [95% confidence interval (CI) 4.30–87.64]; after adjustment for age at di-

agnosis and gender, the HR was 10.35 (95% CI 2.01–53.24). In the subgroup of patients with PTCs with TERT promoter mutations, the HR for disease-specific mortality was 11.63 (95% CI 1.93–70.15); after adjustment for age at diagnosis and gender, the HR was 23.81 (95% CI 1.36–415.76). The low number of deaths in the group of patients with FTCs precluded a similar regression analysis.

Table 4. Thyroid Cancer-Specific Mortality and Hazard Ratios for Patients With TERT wt vs TERT Mutated Tumors

Type of Cancer	Mortality, n, %				Mortality Rate (Deaths per 1000 Person-Years)		Hazard Ratio (95% CI)			
	Overall	TERT wt	TERT Mutated	P Value ^a	TERT wt	TERT Mutated	Unadjusted	P Value	Adjusted ^b	P Value
DTC	7/23 (2.2)	3/298 (1.0)	4/25 (16.0)	<.001	1.17	21.17	19.42 (4.30–87.64)	<.001	10.35 (2.01–53.24)	.005
PTC	5/284 (1.8)	3/265 (1.1)	2/19 (10.5)	.001	1.36	13.64	11.63 (1.93–70.15)	.007	23.81 (1.36–415.76)	.03
FTC	2/70 (2.8)	0/58	2/12 (16.7)	<.001	0	47.23	^c	^c	^c	^c

Abbreviations: mut, mutated; wt, wild type.

^a Log-rank P values.

^b Adjusted for age and gender (Cox regression).

^c Due to the low numbers, a regression analysis was not performed for FTC patients.

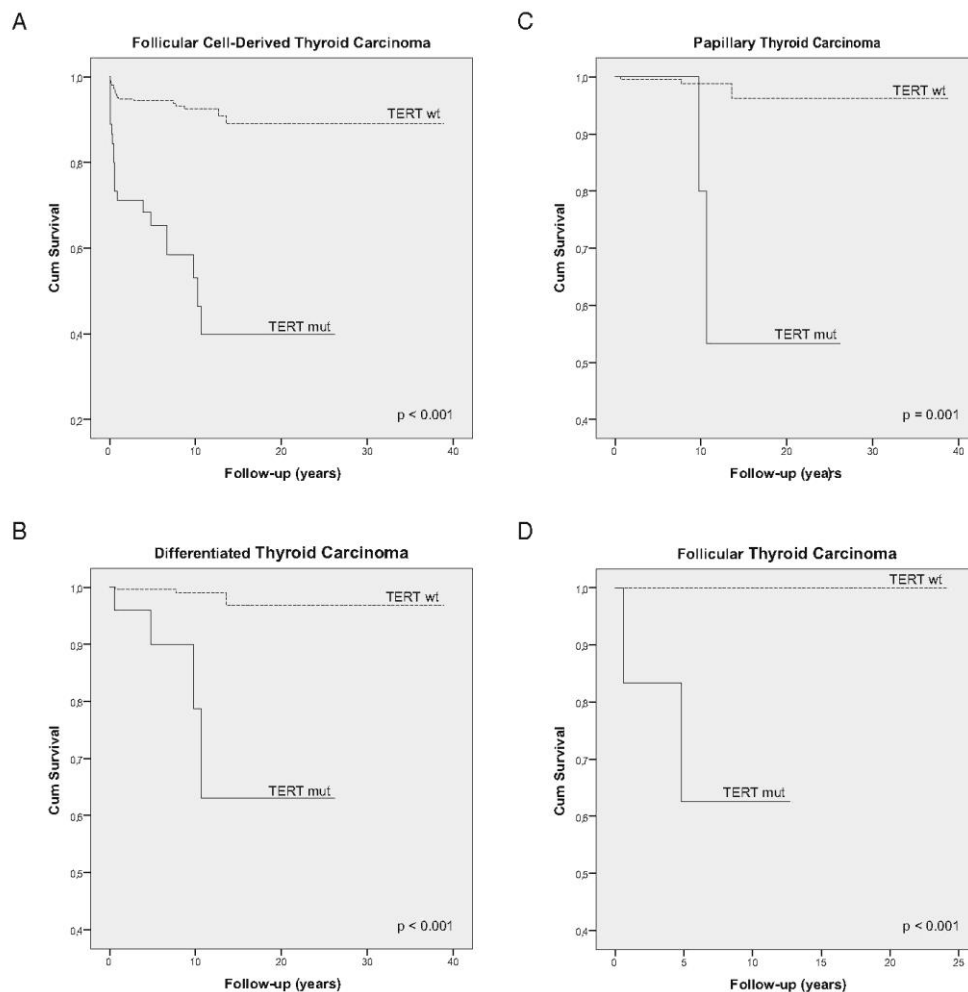


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of thyroid carcinoma-specific survival by *TERT* mutation status representing the whole follicular cell-derived thyroid carcinoma series (A), the group of patients with differentiated thyroid carcinoma (B), the subgroups of patients with PTCs (C), and the subgroup of patients with FTCs (D). *TERT* mut, *TERT* promoter mutation; *TERT* wt, *TERT* promoter wild type

Discussion

In the present study, we show that *TERT* promoter mutations are an indicator of tumor aggressiveness in DTCs, being associated with distant metastases, worse response to treatment, and poor outcome.

TERT promoter mutations were present in 12.4% of the FCDTC tumors, being detected in PTCs and FTCs (7.5% and 17.1%, respectively), PDCs and ATCs (29.0% and 33.3%, respectively). The frequencies of *TERT* promoter

mutations in DTCs are similar to those recently reported by Liu et al (19) and lower than those reported by Landa et al (20) and Liu et al (26). *TERT* promoter mutations were not detected in normal thyroid or in benign lesions, such as nodular goiter, adenoma, or thyroiditis, or in medullary thyroid carcinomas. These negative findings fit with previous reports (15, 19, 20). No *TERT* promoter mutations were detected in benign or malignant tumors from Chernobyl-irradiated patients, suggesting that irradiation is not a strong etiological factor for the occurrence of such mutations.

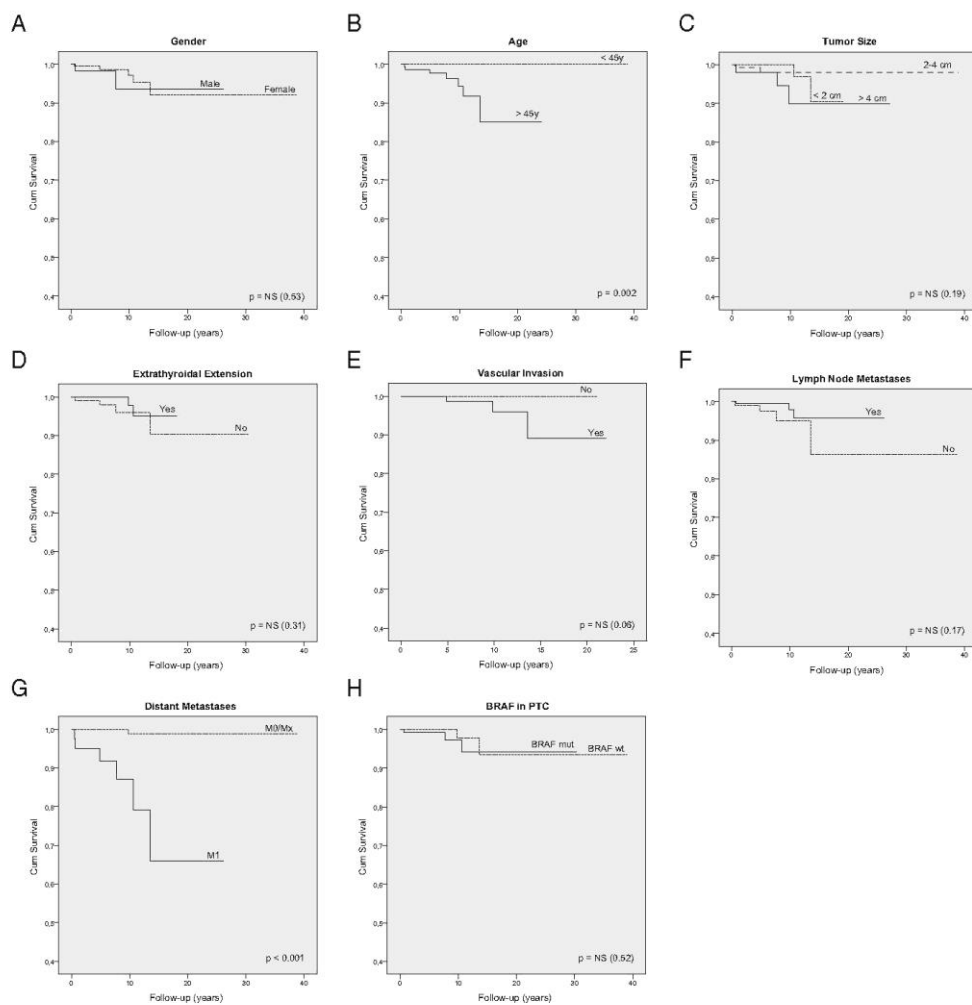


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves of DTC-specific survival according to the different clinicopathological and molecular features: gender (A), age (B), tumor size (C), extrathyroidal extension (D), vascular invasion (E), lymph node metastases (F), distant metastases (G), and *BRAF* status in PTCs (H).

We did not detect *TERT* promoter mutations in any of the carcinomas displaying oncocytic features (Supplemental Table 1). The absence of mutations may reflect the small size of the series regarding oncocytic variant of PTCs, tall-cell PTCs, and Warthin-like PTCs. This does not hold true, however, regarding FTCs in which *TERT* promoter mutations were not detected in any of the 27 oncocytic cases (0%), in contrast to their presence in 12 of the 43 conventional FTCs (27.9%). We do not know how to explain this finding, which has to be confirmed in larger series, namely of oncocytic PTCs, but we

believe it contributes to reinforce the assumption that oncocytic tumors of the thyroid differ from their nononcocytic counterparts with regard to several genetic and metabolic pathways (25, 27).

The relatively low number of microcarcinomas (11.2%; Table 1), all negative for *TERT* promoter mutations, and the higher percentage of cases with distant metastases (15% of DTCs) in comparison with data reported in some recent series (28, 29) support the assumption that one may be dealing in the present study with higher-stage

cases referred to academic centers. Further studies including lower-risk patients are necessary to establish a more accurate evaluation of the frequency of *TERT* promoter mutations in the different histotypes of FCDTCs.

In DTCs, the presence of *TERT* promoter mutations was associated with older age at diagnosis, larger tumors, higher frequency of distant metastases, and higher tumor stage. These results are in line with previous reports indicating that *TERT* promoter mutations were more prevalent in histological categories of thyroid carcinomas classically associated with more aggressive clinical behavior (15, 19, 20). The most important added value of the present study is that we found evidence showing that patients with *TERT* mutated tumors had decreased survival when compared with patients with tumors harboring wild-type *TERT* and, moreover, that this holds true for the whole DTC series as well as for PTCs and FTCs independently. The usefulness of *TERT* mutations as a prognostic marker is particularly relevant in DTCs due to the combination of two main reasons: only a small percentage of such carcinomas behave aggressively and may turn ultimately lethal, and there is a lack of good prognostic indicators in this setting.

TERT promoter mutations were more prevalent in PDTs (29.0%) and ATCs (33.3%) than in DTCs. Although we did not find an association between *TERT* promoter mutations and mortality in this subset of less differentiated tumors (data not shown), the dismal outcome of most patients with poorly differentiated/undifferentiated carcinomas and their aggressive clinicopathological characteristics raises doubts about the prognostic utility of molecular markers, such as *TERT* promoter mutations, from a clinical standpoint. Furthermore, the small number of patients in each of the two categories does not allow a definitive conclusion on this issue. We also believe that the predictive value of *TERT* promoter mutations for disease-specific mortality in patients with FTCs should be clarified in larger series because we acknowledge the small number of events that occurred in our series due to the relatively low number of FTCs patients with appropriate follow-up.

Although the overall prognosis of patients with DTCs is usually good, with a 10-year survival rate higher than 85% in most series (30), the outcome of older patients with distant metastases is guarded, with a 5-year survival of approximately 30%–40% (31). Due to the clinical relevance of distant metastases, we performed a multivariate logistic regression evaluating the clinicopathological and molecular factors associated with distant metastasization. The presence of *TERT* promoter mutations was a significant predictor of distant metastases after adjusting for gender, tumor size, or vascular invasion, independently. When all the features associated with distant metastases in the univariate model (gender, tumor size, vascular invasion, and *TERT* muta-

tional status) were included in the regression, vascular invasion became the only independent predictor. From the clinical standpoint, vascular invasion is information available only after surgery and all the others [age, gender, tumor size (estimated by ultrasound), and *TERT* mutational status (if feasible in fine needle aspiration cytology)] may in the near future be available for physicians before surgery, allowing a better risk stratification before the first treatment approach. For this reason, we decided to present the results of the multivariate model with and without the input of vascular invasion (Table 3).

The association of *TERT* promoter mutations with decreased survival in DTCs was kept irrespectively of age at diagnosis and gender. In addition to *TERT* promoter mutations and distant metastases, age at diagnosis was the only factor significantly associated with decreased survival in the present study. Age at diagnosis is a well-established predictor of mortality in DTCs, and this has been recognized by the Union for International Cancer Control/AJCC, setting age at diagnosis as a major determinant in the staging system (32). Even though male gender was not associated with decreased survival in our study, a large population-based cancer registry (Surveillance, Epidemiology and End-Results) showed that male gender may be associated with increased mortality (33). This finding fits with our results showing that male gender was significantly associated with distant metastases and disease persistence at the end of follow-up. These were the reasons that we decided to adjust the HR for both age at diagnosis and gender. The independent association of *TERT* promoter mutations with decreased survival holds true if we adjust the HR either for age at diagnosis (data not shown) or for both age at diagnosis and gender (Table 4).

Liu et al (26) recently published a report studying the frequency of *TERT* promoter mutations in a series of 107 FCDTCs (51 PTCs, 36 FTCs, and 20 ATCs) and its relationship with older age and shorter telomeres. The authors also found an association between *TERT* promoter mutations and distant metastases as well as shorter disease-specific survival in the whole FCDTC series and in PTCs. The results of this study fit in general with our findings. However, it should be emphasized that the report of Liu et al (26) was conducted in a small group of patients with extremely aggressive DTCs (51 PTCs and 36 FTCs, with a disease-specific mortality of 24.1%). At variance with the study by Liu et al, the disease-specific mortality in the present study is similar to those reported in most of the large recent series (34, 35). Furthermore, our study allowed a regression analysis in which the effect of *TERT* mutational status on survival could be determined and adjusted for age at diagnosis and gender. Taken together, we may say that, although performed in different populations, both studies indicate that *TERT* pro-

moter mutations may serve as a marker of aggressive disease and poor outcome in DTCs.

Our data show that DTC patients with *TERT* promoter-mutated tumors were less prone to be free of disease at the end of follow-up and were submitted to more radioiodine treatments with higher cumulative activities as well as to a greater number of other treatment modalities. Combining this information with the worse outcome of the patients, it is likely that, in the future, *TERT* promoter mutational status may be used to individualize treatment decisions, namely the type of surgery (if the molecular study proves to be feasible in fine needle aspiration cytology), the decision to perform radioiodine ablation, and the amount of ^{131}I to administer to patients. The latter issue is particularly relevant due to the current trend to reduce the number of patients submitted to radioiodine ablation and to use lower doses (36–38). International consensus and guidelines may also take into account *TERT* promoter mutational status to establish the best follow-up strategy for the individual patient.

Considering that DNA or RNA of *TERT* has been used as vaccines to induce T-helper cells and specific cytotoxic T lymphocyte responses against *TERT*-positive tumors (39, 40), it seems possible that, in the future, *TERT*-based immunotherapies may be tailored for patients with *TERT*-mutated carcinomas because these tumors carry a poor outcome, possibly because of a worse response to current therapies. Further studies are necessary to address this issue.

All the institutions involved in the present study followed international guidelines, but there were discrepancies regarding prophylactic central lymph node dissection. Taking into consideration that the role of such dissection is currently under debate and the existing differences from institution to institution of the present study, we did not investigate the implications of prophylactic lymph node dissection on the outcome.

TERT mutations were associated with *BRAF* mutations, highlighting the coexistence of activation of *BRAF* and of *TERT* genes, previously reported in melanoma (16) and thyroid (15). Horn et al (16) advanced that the mutation creates newly consensus binding sites for *TCF* subfamily transcription factors (Elk1 and Elk4) that can be activated by *BRAF*. Both in thyroid carcinoma and in melanoma, it seems that a background status of activated *BRAF* enhances the effects of *TERT* promoter mutation. Our previous results in *TERT* mRNA expression corroborated this assumption showing an increased *TERT* expression in tumors harboring *BRAF* and *TERT* mutation (15). However, the concurrence or coexistence in the current study of *TERT* and *BRAF* mutations was not associated with increased aggressiveness and worse outcome in comparison with the presence of *TERT* mutations alone (Supplemental Table 3 and Supplemental Figure 2). None-

theless, these results should be viewed with caution due to the low number of patients in each of the two groups.

It remains to be fully clarified the biological meaning of the association between *TERT* promoter mutations and the metastatic nature of thyroid tumors. Being one of the hallmarks of cancer and enabling replicative immortality of cancer cells, *TERT* activation appears to be independent of the tumor microenvironment because there is no substantive evidence for stromal contributions to telomere stabilization in cancer cells (41). Our findings suggest that a link between telomerase activity and metastatic capacity may exist. We can speculate that this link may be inherent to the extended survival of *TERT*-mutated cells during the circulation phase and/or the homing in distant places, rather than to the increased invasiveness of such cells, but the discussion of this issue is beyond the scope of the present study.

We conclude that *TERT* promoter mutations are an indicator of clinical aggressiveness of follicular cell-derived thyroid carcinomas, being associated with distant metastases, worse response to treatment, and poor outcome. The detection of such mutations appears to be, per se, a promising prognostic indicator in DTCs and PTCs.

Acknowledgments

We thank Margarida Marques (Department of Technology and Information of the University Hospital of Coimbra) for the valuable review of the statistical analysis.

We acknowledge GENZYME for funding our work through a research project.

Address all correspondence and requests for reprints to: Paula Soares, Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Rua Dr Roberto Frias s/n, 4200-465 Porto, Portugal. E-mail: psoares@ipatimup.pt.

This study was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology through PhD Grant SFRH/BD/81940/2011 (to J.V.); PhD Grant SFRH/BD/87887/2012 (to C.T.); PhD Grant SFRH/BD/79135/2011 (to A.A.); and the Scientific Investigation Project PICIC/83037/2007. Further funding was obtained from the project “Microenvironment, Metabolism and Cancer,” partially supported by Programa Operacional Regional do Norte (ON.2-O Novo Norte), under the Quadro de Referência Estratégico Nacional, and through the European Regional Development Fund. The work of J.M.C.-T. was supported by Grant PI12/00749-FEDER from the Instituto de Salud Carlos III, the Ministry of Economy and Competitiveness (Madrid, Spain).

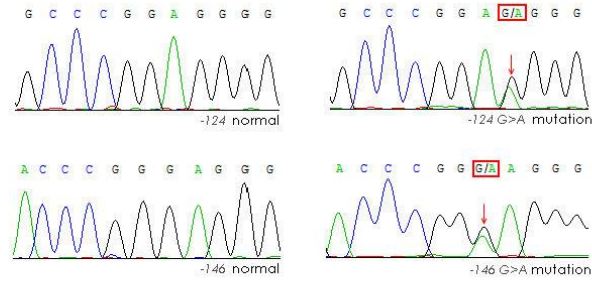
The Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP) is an associate laboratory of the Portuguese Ministry of Science, Technology, and Higher Education, which is partially supported by the Foundation for Science and Technology.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57–70.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266:2011–2015.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33:787–791.
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*. 1997;3:1271–1274.
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*. 1995;14:4240–4248.
- Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I, Baptist M, Roger PP. Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1991;5:727–754.
- Preto A, Cameselle-Teijeiro J, Moldes-Boullosa J, et al. Telomerase expression and proliferative activity suggest a stem cell role for thyroid solid cell nests. *Mod Pathol*. 2004;17:819–826.
- Matthews P, Jones CJ, Skinner J, Haughton M, de Micco C, Wynford-Thomas D. Telomerase activity and telomere length in thyroid neoplasia: biological and clinical implications. *J Pathol*. 2001;194: 183–193.
- Soares P, Lima J, Preto A, et al. Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Curr Genomics*. 2011;12:609–617.
- Cantara S, Pisu M, Frau DV, et al. Telomere abnormalities and chromosome fragility in patients affected by familial papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:E1327–E1331.
- Capezone M, Cantara S, Marchisotta S, et al. Telomere length in neoplastic and nonneoplastic tissues of patients with familial and sporadic papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:E1852–E1856.
- Hoang-Vu C, Boltze C, Gimm O, et al. Expression of telomerase genes in thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2002;21:265–272.
- Takano T, Ito Y, Matsuzuka F, et al. Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase, thyroglobulin and thyroid transcription factor 1 mRNAs in anaplastic thyroid carcinoma tissues and cell lines. *Oncol Rep*. 2007;18:715–720.
- Brousset P, Chaouche N, Leprat F, et al. Telomerase activity in human thyroid carcinomas originating from the follicular cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:4214–4216.
- Vinagre J, Almeida A, Populo H, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013;4:2185.
- Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;339:959–961.
- Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;339:957–959.
- Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110: 6021–6026.
- Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Related Cancer*. 2013;20:603–610.
- Landa I, Ganly I, Chan TA, et al. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1562–E1566.
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004.
- Lima J, Trovisco V, Soares P, et al. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:4267–4271.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003;22:4578–4580.
- Trovisco V, Soares P, Preto A, et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch*. 2005;446:589–595.
- de Vries MM, Celestino R, Castro P, et al. RET/PTC rearrangement is prevalent in follicular Hurthle cell carcinomas. *Histopathology*. 2012;61:833–843.
- Liu T, Wang N, Cao J, et al. The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas [published online October 21, 2013]. *Oncogene*. doi:10.1038/ onc.2013.446.
- Jacques C, Guillotin D, Fontaine JF, et al. DNA microarray and miRNA analyses reinforce the classification of follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E981–E989.
- Elisei R, Molinaro E, Agate L, et al. Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:1516–1527.
- Jung CK, Little MP, Lubin JH, et al. 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–E285.
- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53 856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985–1995. *Cancer*. 1998;83:2638–2648.
- Sampson E, Brierley JD, Le LW, Rotstein L, Tsang RW. Clinical management and outcome of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer presenting with distant metastasis at diagnosis. *Cancer*. 2007;110:1451–1456.
- Sobin LH, Wittekind Ch. *UICC: TNM Classification of Malignant Tumors*. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.
- Nilubol N, Zhang L, Kebebew E. Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. *Thyroid*. 2013;23:695–702.
- Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA*. 2013;309:1493–1501.
- Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist*. 2007;12:20–37.
- Mallick U, Harmer C, Yap B, et al. Ablation with low-dose radioiodine and thyrotropin α in thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:1674–1685.
- Schlumberger M, Catargi B, Borget I, et al. Strategies of radioiodine ablation in patients with low-risk thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:1663–1673.
- Mallick U, Harmer C, Hackshaw A, Moss L, Io NTMG. Iodine or Not (IoN) for low-risk differentiated thyroid cancer: the next UK National Cancer Research Network randomised trial following HiLo. *Clin Oncol*. 2012;24:159–161.
- Liao ZL, Tang XD, Lu MH, et al. Antitumor effect of new multiple antigen peptide based on HLA-A0201-restricted CTL epitopes of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Cancer Sci*. 2012; 103:1920–1928.
- Dosset M, Vauchy C, Beziaud L, Adotevi O, Godet Y. Universal tumor-reactive helper peptides from telomerase as new tools for anticancer vaccination. *Oncotimmunology*. 2013;2:e23430.
- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21:309–322.

Supplemental Figure 1 - Sequencing chromatographs of the *TERT* promoter locus in genomic tumor DNA obtained by Sanger sequencing (-124 normal, -124 G>A mutation, -146 normal, -146 G>A mutation)



Supplemental Table 1 – Histological diagnoses of the 647 thyroid tissue samples searched for the presence of *TERT* promoter mutations

Histotypes	No. of cases	<i>TERT</i> n (%)
Normal thyroid	30	0 (0.0)
Lymphocytic thyroiditis	9	0 (0.0)
Nodular goiter	12	0 (0.0)
Follicular adenoma		
Conventional	53	0 (0.0)
Oncocytic variant	7	0 (0.0)
Follicular carcinoma		
Conventional	43	12 (27.9)
Oncocytic variant	27	0 (0.0)
Papillary carcinoma		
Conventional	230	19 (8.3)
Follicular variant	74	5 (6.8)
Oncocytic variant		
Papillary architecture	6	0 (0.0)
Follicular architecture	3	0 (0.0)
Solid variant	7	0 (0.0)
Warthin-like variant	6	0 (0.0)
Tall-cell variant	2	0 (0.0)
Mucoepidermoid carcinoma	4	1 (25.0)
Poorly differentiated carcinoma	31	9 (29.0)
Anaplastic carcinoma	36	12 (33.3)
Medullary carcinoma	28	0 (0.0)
Post-Chernobyl series		
Follicular adenomas	12	0 (0.0)
Papillary carcinoma	27	0 (0.0)

Supplemental Table 2 - Summary of treatment procedures in differentiated thyroid carcinomas

	All patients	<i>TERT</i> wild type	<i>TERT</i> mutated	p value
Number of radioiodine therapies	1.96±1.29	1.81±1.16	2.69±1.78	0.009
Cumulative activity (GBq/mCi)	9.8±8.9/ 264.1±240.4	9.0±8.1/ 242.8±218.1	15.8±12.4/ 425.8±334.8	0.004
Number of additional treatments*	1.36±1.73	1.13±1.52	2.56±2.45	0.001

*Number of additional treatments includes surgical procedures, external beam irradiation and treatment with tyrosine kinase inhibitors. Each surgical procedure was counted as one «additional treatment». Treatment with tyrosine kinase inhibitors was counted as one «additional treatment» if the patient took the drug for more than six months, and regardless of the utilization of more than one drug of the same class.

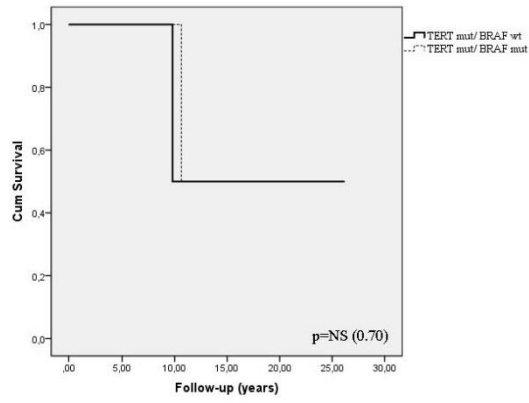
Supplemental Table 3 - Clinico-pathological data of patients with PTC harboring *TERT* promoter mutations and wild-type or mutated *BRAF*

	All patients	<i>TERT</i> mut / <i>BRAF</i> wt	<i>TERT</i> mut / <i>BRAF</i> mut	<i>p</i> value
Clinico-pathological				
Age at diagnosis, y (n=24)	58.4±13.2	52.2±8.0	60.0±14.4	NS (0.22)*
Gender (n=24)				
Female	16 (66.7)	5 (83.3)	11 (61.1)	NS (0.32)
Male	8 (33.3)	1 (16.7%)	7 (38.9)	
Mean tumor size, cm (n=23)	3.2±2.2	2.9±2.1	3.3±2.3	NS (0.66)*
Extrathyroidal extension (n=18)				
Present	14 (77.8)	3 (60.0)	11 (84.6)	NS (0.26)
Vascular invasion (n=16)				
Present	5 (31.3)	2 (66.7)	3 (23.1)	NS (0.14)
LN metastases (n=23)				
Present	18 (78.3)	5 (83.3)	13 (76.5)	NS (0.73)
Distant metastases (n=18)				
Present	5 (27.8)	3 (50.0)	2 (16.7)	NS (0.14)
Stage (n=14)				
I	3 (21.4)	0	3 (37.5)	NS (0.29)
II	1 (7.1)	1 (16.7)	0	
III	4 (28.6)	2 (33.3)	2 (25.0)	
IV	6 (42.9)	3 (50.0)	3 (37.5)	
Clinical status at the end of follow-up (n=12)				
Disease persistence	6 (50.0)	4 (66.7)	2 (33.3)	NS (0.25)
Disease-specific mortality (n=19)	2 (10.5)	1 (16.7)	1 (7.7)	NS (0.70)**

* Due to low numbers in each group, Mann-Whitney U test was used

** Kaplan-Meier log-rank *p* values

Supplemental Figure 2 – Kaplan-Meier disease-specific survival curve for both groups (*TERT* mutated / *BRAF* wild-type and *TERT* mutated / *BRAF* mutated)



Artigo V

– Soares P, Celestino R, **Melo M**, Fonseca E, Sobrinho-Simões M. Prognostic biomarkers in thyroid cancer. *Virchows Arch.* 2014 Mar;464(3):333-46. doi: 10.1007/s00428-013-1521-2. Epub 2014 Feb 1.

Prognostic biomarkers in thyroid cancer

Paula Soares · Ricardo Celestino · Miguel Melo ·
Elsa Fonseca · Manuel Sobrinho-Simões

Received: 1 October 2013 / Accepted: 25 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Thyroid carcinomas represent a challenging problem from the prognostic standpoint. Despite an overall good prognosis of the most frequent endocrine malignancy, 10–15 % of papillary thyroid carcinomas (PTCs) turn refractory to radioactive iodine therapy. The increased incidence of thyroid cancer has led to the search for solid prognostic biomarkers that predict the behaviour of these tumours. Clinical and histopathological prognostic factors remain the only safe elements to be used for diagnosis and prognosis of patients with thyroid tumours. Despite the huge amount of genetic information of thyroid tumours, very few new markers revealed diagnostic or prognostic value per se. *BRAF* mutation can have some value if associated to other clinico-pathological parameters, or in the particular setting of iodine refractory tumours. Others can prove interesting in the future as predictive biomarkers of therapeutic response, but more studies are needed to confirm these potential biomarkers.

Keywords Thyroid · Cancer · Biomarker · Prognostic

P. Soares · R. Celestino · M. Melo · E. Fonseca ·
M. Sobrinho-Simões
Institute of Molecular Pathology and Immunology of University of
Porto (IPATIMUP), Rua Dr Roberto Frias s/n, 4200-465 Porto,
Portugal

P. Soares (✉) · E. Fonseca · M. Sobrinho-Simões
Department of Pathology and Oncology, Faculty of Medicine,
University of Porto, Porto, Portugal
e-mail: psoares@ipatimup.pt

M. Melo
Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

M. Melo
Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, University
and Hospital Center of Coimbra, Coimbra, Portugal

E. Fonseca · M. Sobrinho-Simões
Department of Pathology, Hospital São João, Porto, Portugal

Introduction

For decades, thyroid carcinomas have been known to represent a particularly challenging problem from the prognostic standpoint since they encompass one of the least lethal human cancer — papillary thyroid carcinoma (PTC) — and, in the other side of the spectrum, one of the deadliest forms of cancer, the anaplastic or undifferentiated thyroid carcinoma (UC).

Despite carrying an overall good, or even very good prognosis, PTC, which is the most frequently occurring endocrine malignancy in humans, can be divided into two subgroups: a large majority that do not cause patients death and a minority that follow a more aggressive clinical course and may lead to a fatal outcome.

Another prognostic peculiarity of PTC resides in the fact that, at variance with almost all other malignant tumours, the presence of regional lymph node metastases does not allow to separate the two subgroups carrying good and guarded prognosis.

Part of the difficulties in the prognostic evaluation of PTC stems from the availability of an excellent treatment in most of the cases: radioactive iodine after total thyroidectomy. This approach is usually successful regardless of the presence of nodal metastases (and, in young patients, even of the presence of lung metastases). This does not hold true in 10–15 % of PTCs which after a positive response to therapy turn, for poorly understood reasons, unresponsive to radioactive iodine and may cause the patient's death.

The acknowledgment of the aforementioned progression of some PTCs towards less differentiated tumours, together with the long established knowledge on the frequent multicentricity of PTC, led some authors to advocate that every PTC should be treated by total thyroidectomy and radioactive iodine. Incidentally, if one follows the same reasoning and take into consideration that a large percentage of PTCs displays occult lymph node metastases, it would make sense to suggest that

Published online: 01 February 2014

 Springer

every patient with PTC should be submitted, besides total thyroidectomy, to a more or less radical lymphadenectomy.

The adequacy of such recommendation would be disputable in any case since it is known that the large majority of PTCs do not cause clinical problems even after conservative surgical treatment. The situation turns, however, unbearable if one includes into the equation the huge number of so-called papillary microcarcinomas (present in 5–20 % of the adult population) that would also require total thyroidectomy despite almost never causing any clinical problem at all.

After the recent development of the genetic analysis of thyroid tumours, many of the above-mentioned problems started being addressed using a molecular approach that has contribute to re-shape the prognostic strategy in three main aspects.

The first concerns the incorporation of molecular features in the prognostic evaluation of both well-differentiated thyroid carcinomas (DTC), including PTC and follicular thyroid carcinomas (FTC), and poorly differentiated carcinomas (PDC). This incorporation should not be done just as an addition of new, isolated, data but, whenever possible, should be used in an articulated manner with the histological features (e.g., topography and tissue heterogeneity).

The second aspect concerns the evolution towards the identification of predictive rather than pure prognostic factors. This trend holds true regarding the identification of nuclear and mitochondrial structural genetic alterations that can serve as therapeutic targets, as well as biomarkers of progression towards tumours less prone to respond to radioactive iodine.

The third point is a sort of corollary of the two aforementioned aspects in the setting of cytopathology. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) has long ago proved to be a valuable method for diagnosing thyroid nodules and for helping therapeutic decisions. Nowadays, the challenge is to incorporate in FNAB the molecular data able to provide a more precise diagnosis in borderline lesions and, whenever dealing with an unequivocal PTC, a better approach for the surgical treatment.

In the following sections, we will sequentially review the clinical, histopathological and molecular features that have been advanced as useful prognostic factors in thyroid carcinomas of follicular cell origin. The prognosis of patients with medullary carcinoma that originate from C cells will not be addressed.

Clinical prognostic factors

As referred above, the prognosis of DTC is considered to be very good, with a 10-year survival rate higher

than 85 % in most series [1–3]. Several prognostic factors have proved useful to separate the group of patients with low risk of recurrence or death from those with intermediate to high risk (Table 1). Most of these factors can be assessed at the time of diagnosis and can be used to select the most appropriate initial treatment. Other data are only available at the time or soon after the initial therapeutic approach and may then be taken into account to fine tailor the follow-up of patients. Many of the factors are strongly inter-related and are not independent predictors of patients' outcome leading to the development of several scoring systems that allocate patients in groups with similar prognosis.

Staging

Staging is considered the most important prognostic factor in thyroid cancer as in other human cancer models. The prognosis classification systems take into account individual clinical and pathologic factors and combine them to assess the risk of mortality and recurrence from thyroid cancer [see below scoring systems and pTNM staging (Tables 2 and 3)].

Age

Age at diagnosis is an important prognostic factor for mortality in patients with DTC. The adverse effect of age on prognosis increases gradually with each decade, particularly after 40–45 years [4, 5]. For practical purposes, patients diagnosed before 45 have a better prognosis than older patients. This cut-off value — 45 — is one of the major determinants used in the UICC/AJCC (Union Internationale Contre le Cancer/American Joint Cancer Committee) staging system. This relationship is consistent with the observation that children have a low mortality rate, even though extensive disease with metastases is frequent at presentation [6].

Older patients are more likely to have aggressive histologic variants, extensive neck disease and distant metastases at

Table 1 Clinical prognostic factors

Well established	Controversial or recently recognized
Age	Family history of DTC
Gender	Auto-immune thyroid disease ^a
Extent of primary thyroidectomy	Prophylactic central lymph node dissection
Postoperative stimulated thyroglobulin	Preoperative TSH

^aClinically evident Hashimoto's thyroiditis is associated with a better prognosis, while Graves' disease is associated with a worse outcome

Table 2 UICC/AJCC staging system for differentiated thyroid carcinomaUICC/AJCC TNM staging system (7th edition)^a

T — Primary Tumor

T1 — Tumor ≤ 2 cm in greatest dimension limited to the thyroidT1a — Tumor ≤ 1 cm, limited to the thyroidT1b — Tumor > 1 cm but ≤ 2 cm in greatest dimension, limited to the thyroidT2 — Tumor > 2 cm but ≤ 4 cm in greatest dimension, limited to the thyroidT3 — Tumor > 4 cm in greatest dimension limited to the thyroid or any tumor with minimal extrathyroid extension (e.g., extension to sternothyroid muscle or perithyroid soft tissues)T4a^b — Tumor of any size extending beyond the thyroid capsule to invade subcutaneous soft tissues, larynx, trachea, esophagus, or recurrent laryngeal nerveT4b^b — Tumor invades prevertebral fascia or encases carotid artery or mediastinal vessels

N — Regional lymph nodes

Nx — Regional lymph nodes cannot be assessed

N0 — No regional lymph node metastasis

N1a — Metastases to Level VI (pretracheal, paratracheal, and prelaryngeal/Delphian lymph nodes)

N1b — Metastases to unilateral, bilateral, or contralateral cervical (Levels I, II, III, IV, or V) or retropharyngeal or superior mediastinal lymph nodes (Level VII)

M — Distant metastases

Mx — Distant metastases cannot be assessed

M0 — No distant metastases

M1 — Presence of distant metastases

Staging

Age <45 years

Stage I

Any T, any N, M0

Stage II

Any T, any N, M1

Age ≥ 45 years

Stage I

T1, N0, M0

Stage II

T2, N0, M0

Stage III

T3, N0, M0

T1, N1a, M0

T2, N1a, M0

T3, N1a, M0

Stage IVA

T4a, N0, M0

T4a, N1a, M0

T1, N1b, M0

T2, N1b, M0

T3, N1b, M0

T4a, N1b, M0

Stage IVB

T4b, Any N, M0

Stage IVC

Any T, any N, M1

^a Adapted from AJCC: thyroid. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC Cancer staging manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, 87–96^b All anaplastic thyroid carcinomas are considered as T4 (T4a—intrathyroidal anaplastic thyroid carcinoma; T4b — anaplastic carcinoma with gross extrathyroid extension)

diagnosis. Tumours tend to be less differentiated in the elderly, with lower ¹³¹I uptake in metastases in comparison with

younger subjects [7], and older patients develop recurrences more frequently and more rapidly after initial treatment.

Table 3 An overview of prognostic scoring systems

AGES

- For papillary thyroid carcinoma
- 0.05 × age in years (if age ≥40) or +0 (if age <40)
 - +1 (if grade 2) or +3 (if grade 3 or 4)
 - +1 (if extrathyroidal tumour invasion)
 - +3 (if distant metastases present)
 - +0.2 × tumour size (max. diameter in cm)
- Group 1: AGES score <4.00
 Group 2: AGES score =4.00–4.99
 Group 3: AGES score =5.00–5.99
 Group 4: AGES score ≥6.00

AMES for differentiated thyroid carcinoma

Low risk

- A. Age at diagnosis <41 years for men, <51 years for women, without metastases
- B. All older patients with:
 1. Intrathyroidal papillary carcinoma or minor tumour capsular involvement follicular carcinoma and
 2. Primary tumour <5 cm in diameter and
 3. No distant metastases

High risk

- A. All patients with distant metastases
- B. All older patients with:
 1. Extrathyroidal papillary carcinoma or major tumour capsular involvement follicular carcinoma and
 2. Primary carcinoma tumour 5 cm in diameter or larger regardless of extent of disease

De Groot's Clinical classification for differentiated thyroid carcinoma

- Class I: tumours confined to the thyroid gland
- Class II: patients with cervical nodular metastases
- Class III: patients with tumour extending beyond the thyroid gland or with incompletely resected nodular disease
- Class IV: patients with distant metastases

MACIS for papillary thyroid carcinoma

- 3.1 (if age <39 years) or 0.08 × age (if age ≥40)
 - +0.3 × tumour size (max. diameter in cm)
 - +1 if incompletely resected
 - +1 if locally invasive
 - +3 if distant metastases present.
- Group 1: Macis score <6.00
 Group 2: Macis score =6.00–6.99
 Group 3: Macis score =7.00–7.99
 Group 4: Macis score ≥8.00

National thyroid cancer treatment cooperative study group (NTCTCS) for all thyroid carcinomas

	Tumor type			
	PTC		FTC	
	Age <45 years	Age ≥45 years	Age <45 years	Age ≥45 years
Primary tumour size (cm)				
< 1	I	I	I	II
1–4	I	II	I	III
>4	II	III	II	III
Primary tumour description				
Microscopic multifocal	I	II	I	III

Table 3 (continued)

Macroscopic multifocal	I	II	II	III
Macroscopic capsule invasion	I	II	II	III
Microscopic extraglandular	I	II	I	III
Macroscopic extraglandular	II	III	II	III
Poor differentiation	–	–	III	IV
Metastases				
Cervical lymph nodes	I	III	I	III
Extracervical lymph nodes	III	IV	III	IV

Gender

The incidence of DTC is three times higher in females [2, 8]. Nevertheless, the estimated rates of death in women are only 1.3 times higher than the death rate in men in the USA [8]. In some series, male patients tend to have more advanced disease diagnosed at an older age, have lower disease-free survival and higher mortality than female patients [2, 9]. This has been confirmed in a recent analysis focusing on disease-specific survival of a large population-based cancer registry (Surveillance, Epidemiology and End Results [SEER]) from 1988 to 2007 [10]. Men had higher thyroid cancer-specific mortality and lower disease-specific survival, but male gender was not an independent determinant of the latter.

Family history

Studies addressing the aggressiveness of familial DTC in comparison with sporadic DTC provide conflicting results [11]. Some series demonstrated an association between familial non-medullary thyroid carcinoma and more frequent multifocality [12, 13], extrathyroidal extension [13], lymph node involvement [13], recurrence [12] and disease-free survival [12]. These results were not confirmed in other series [14, 15].

Auto-immune thyroid disease

The influence of clinically evident auto-immune thyroid disease on the prognosis of DTC is controversial [16]. In some series, DTC appears to carry a better prognosis in patients with previously known Hashimoto's thyroiditis. These results were recently corroborated by a clinical study that included more than 700 patients [17]. Hashimoto's thyroiditis was an independent predictor of lower rate of lymph nodes involvement and persistent disease at the end of follow-up [17]. At variance with this, the coexistence of Graves' disease is associated with a worse prognosis in clinically evident tumours (not in occult or microPTC). Patients with previously known Graves' disease tend to present with more extensive neck disease, the risk of metastasis is higher and mortality rate is also higher [18, 19].

Preoperative TSH levels

Serum TSH is directly associated with risk of cancer in a thyroid nodule [20]. It was recently demonstrated that preoperative TSH levels are associated with higher stage at diagnosis, gross extrathyroidal extension and cervical lymph node metastasis [21].

Extent of primary surgery

The extent of thyroidectomy has *major* prognostic implications. Total or near-total thyroidectomy significantly improves recurrence and survival rates for tumours >1.0 cm [22] and it is now the procedure recommended by the American [23] and European Guidelines [24] for suspicious nodules >1.0 cm. Incomplete removal of neoplastic foci significantly affects the prognosis.

The utility of prophylactic central lymph node dissection is uncertain. The procedure allows a more precise staging [25] but is associated with increased morbidity; furthermore, its effectiveness in decreasing local recurrences and mortality is uncertain [26, 27].

Postoperative thyroglobulin

TSH-stimulated thyroglobulin after surgery or at the time of radioiodine ablation is an important prognostic indicator, whether the stimulation is performed with endogenous [28] or recombinant human TSH [29]. The negative predictive value for disease persistence 1 year after the initial treatment is above 90 % in most studies. The putative role of non-stimulated thyroglobulin after surgery as a prognostic marker is under debate and may be valuable only in low-risk patients [30].

Scoring systems

Several prognostic scoring systems for predicting disease-specific mortality were developed based on multiple regression analysis of combined clinical and pathological prognostic factors. In clinical practice, the most frequently used is the TNM UICC/AJCC staging system (Table 2). Several other systems proved to be useful and among the more popular are

AGES (Age, tumor Grade, Extent and Size) [31], AMES (Age, distant Metastases, Extent and Size of primary tumour) [32], MACIS (distant Metastases, Age, Completeness of surgery, Invasion of extrathyroidal tissues and Size of the primary tumour) [33], De Groot's Clinical Classification [34] and NTCTCS (National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Classification) (Table 3) [35]. A comparison of the different prognostic systems in DTC demonstrated that the UICC/AJCC staging system clearly outperforms other prognostic systems [36].

Since the aforementioned scoring systems were mainly developed to predict mortality and DTC are usually tumours with good prognosis, both the American Thyroid Association and the European Thyroid Association introduced risk categories to predict recurrence (low, intermediate and high risk) [23, 24].

Histopathological prognostic factors

Histopathology provides the two most important prognostic biomarkers in thyroid cancer: the pTNM staging (enriched by the evaluation of lymph-vascular invasion) and the morphological classification in DTC (encompassing PTC and FTC), PDC and UC.

PTNM staging is the crucial prognostic factor in every type of thyroid cancer. Besides the classical factors highlighted above (size, extrathyroidal extension and distant metastasis), it has been acknowledged the importance of multinodular growth beyond the original bulk of the tumour and the prominence of vascular invasions [37]. Both factors frequently coexist leading to the subclassification of FTC as widely invasive FTC and of PTC as multinodular form of PTC which is not always easy to distinguish from multicentric PTC [38].

The demonstration of vascular invasion, per se, in minimally invasive FTC leads to its subclassification as angioinvasive FTC and to its inclusion together with widely invasive FTC, in the group of FTC cases that should be treated by total thyroidectomy and radioactive therapy. In contrast to this, encapsulated FTC cases without angioinvasive as well as encapsulated, non-invasive follicular variant of PTC (FVPTC) may be treated conservatively (lobectomy) [39].

Regarding the putative prognostic meaning of PTC variants, it is well established that tall cell, columnar cell, multinodular (diffuse) form of FVPTC, diffuse sclerosing PTC are usually accompanied by guarded prognosis, but such prognostic meaning is lost in multivariate analyses (for instance, small, encapsulated columnar cell PTCs do not usually cause any clinical problem) [38]. In the other end of the spectrum, microPTC and encapsulated, non-invasive FVPTC carry good prognosis [38].

The oncocytic (Hürthle cell, oxyphilic) variant of PTC and FTC are associated to worse prognosis in most series not

because the tumours are more aggressive but because they tend to be less responsive to radioiodine therapy [38]. At variance with many types of neuroendocrine tumours, the proliferative rate MIB-1 index or Ki67 index does not carry prognostic significance in DTC. The same does not hold true in some series of PDC in which the mitotic index and prominence of necrosis carry prognostic information. As in almost any type of thyroid carcinoma, pTNM staging provides the most accurate data for evaluating the prognosis of patients with PDC. In this setting, the presence and prominence of vascular invasion play also a major prognostic role as well as the responsiveness to radioactive iodine.

Both in DTC and PDC the degree of aneuploidy as well as some molecular features (*BRAF*, *RAS* and *TP53* point mutations and *RET/PTC* and *PAX8-PPARG* rearrangements) carry marginal prognostic information (see next section) [38].

UCs carry a dreadful prognosis regardless of the morphological and molecular characteristics of the neoplastic cells [40, 41]. As it will be discussed in the next section, there is, however, room to try to find molecular biomarkers that may serve to design targeted therapies.

Molecular prognostic factors

The increased incidence of thyroid cancer due to the detection of incidental papillary thyroid microcarcinomas by neck ultrasound [42, 43], the radioiodine resistance of some thyroid cancers, and the high recurrence rate (about 30 %) of clinically evident thyroid carcinomas [44, 45], imposes a search for more precise and accurate prognostic factors that predicts the behaviour of these tumours. These factors can also provide an important guidance for future targeted therapeutics in radioactive iodine-refractory thyroid cancer.

Several genetic alterations and differentially expressed genes have been identified in thyroid cancer and a putative role as molecular biomarkers of aggressiveness has been assigned to some of them (Table 4). Until now, however, none of them has proven to be robust indicators of staging, recurrence or prognosis, thus preventing their inclusion and acceptance in clinical practice. Despite acknowledging controversial usefulness of such molecular biomarkers, we will review those we consider more promising as prognostic indicators.

Classical genetic markers

The classical markers belong to MAPK and PI3KCA/AKT pathways [46], and include *BRAF* and *RAS* point mutations and *RET/PTC* and *PAX8-PPARG* rearrangements, that represent about 70 % of the molecular alterations present in thyroid cancer. *BRAF* (p.V600E) is the most prevalent (29–69 %) point mutation present in PTC [47, 48] (namely in classic PTC

Table 4 Summary of the data in biomarkers reported to have potential prognostic value in thyroid cancer

Prognostic biomarker	Cancer type (n)	References	Prognostic biomarker	Cancer type (n)	References
Molecular alterations			Protein expression		
Aneuploidy/high S-phase	PDC (16) PDC/UC (4) UC (6) All (26)	[104]	Alpha-Catenin	PTC (173) FTC (33) All (206)	[105]
<i>BRAF</i> mutations	PTC (8890)	[52, 53, 107–112]	Bcl-2	UC (12)	[106]
<i>CTNNB1</i> mutations	PTC (46) FTC (12) PDC (28) UC (29) All (115)	[113]	Beta-Catenin	PTC (46) FTC (12) PDC (28) UC (41) All (127)	[106, 113]
<i>IQGAP</i> copy gain	PTC (205) FTC (107) UC (41)	[115]	Biotinidase	PTC (129)	[114]
<i>RAS</i> mutations	All (353) PTC (91) PDC (65) All (156)	[67, 118]	cMET	PTC (42) FTC (7) All (49)	[116]
<i>RET/PTC</i> rearrangements	PTC (70) FTC (25) UC (8) All (103)	[119, 120]	COX-2	PTC (28) FTC (10) UC (10) All (48)	[117]
			CCR7	PTC (88)	[121]
			CXCR4	PTC (88)	[121]
			Cyclin D1	PTC (305)	[122, 123]
			E-cadherin	PTC (88) FTC (78) UC (12) All (178)	[106, 124, 125]
Gene expression			EGFR	PTC (127)	[126]
CXCL14	PTC (45)	[127]	Ep-ICD	PTC (184)	[128]
CST6	PTC (45)	[127]	Estrogen receptor-related protein	PTC (127)	[126]
DHRS3	PTC (45)	[127]	FoxP3	PTC (253) FTC (13) All (266)	[129]
GLTSCR2	FTC (15)	[130]	Her2/neu	PTC (43) FTC (54) All (97)	[132]
ITIH5	PTC (15) FTC (4) PDC (5) All (24)	[131]	HGF/SF	PTC (42) FTC (7) All (49)	[116]
Mig-6	PTC (125)	[133]	IMP3	PDC (103)	[135]
Muc1	PTC (100)	[134]	MIB-1	UC (12)	[106]
NID2	FTC (15)	[130]	MMP-2	PTC (65)	[137]
SPP1	PTC (45)	[127]	NDRG1	PTC (90) FTC (36) All (126)	[138]
S100A4	PTC (28)	[136]	Osteopontin (OPN)	PTC (71)	[139]
TM7/SF2	FTC (15)	[130]	PPARG	FTC (54) HCC (23) All (77)	[91]
TRIM2	FTC (15)	[130]	P16	PTC (90) FTC (6) All (96)	[140]
UHRF1	PTC (15) FTC (4) PDC (5) All (24)	[131]	P27	PTC (305)	19, 27
miRNAs expression					
miR-34b	PTC (32)	[141]			
miR-130b	PTC (32)	[141]			

Table 4 (continued)

Prognostic biomarker	Cancer type (n)	References	Prognostic biomarker	Cancer type (n)	References
miR-146b	PTC (203)	[141–143]	P53	UC (12)	[106]
miR-221	PTC (100)	[142]	RAS (P21)	PTC (45)	[144]
miR-222	PTC (132)	[141, 142]	RET	PTC (61)	[145]
			Thyroglobulin (TG)	UC (12)	[106]
			Topoisomerase II-alpha	UC (12)	[106]
			VEGF	PTC (274)	[106, 117, 137,
				FTC (10)	146, 147]
				UC (22)	
				All (306)	

being much less prevalent in FVPTC) and leads to the constitutive activation of BRAF kinase and stimulation of the MAPK pathway. *BRAF* mutation (p.V600E) can also be detected in 0–13 % of PDC and 10–35 % of UC [47, 49–51].

BRAF mutation has been associated in many studies with the aggressiveness of PTC: extrathyroidal invasion, lymph node metastasis and advanced TNM stage (see meta-analysis [52]) and, recently, also with PTC mortality [53] when associated with other aggressive features namely extrathyroidal growth. *BRAF* mutation presents a very low positive predictive value (28 %) and a high negative predictive value (87 %) for PTC recurrence [54], suggesting that *BRAF* mutational status in clinical management of PTC should be used with caution. The use of *BRAF* mutation per se for PTC prognosis remains controversial mainly due to the fact that *BRAF* V600E mutation is found in about half of PTCs [46], from which less than 10–15 % of the tumours will display aggressive behaviour [55, 56].

BRAF mutation has also been associated with loss of radioiodine avidity of recurrent PTCs [57–59]. In vitro [60] and in vivo [61] studies confirmed this association. Recently, it was shown that MEK inhibition could restore the radioactive iodine incorporation, turning BRAF or MEK inhibitors a promising target to treat radioactive iodine-refractory thyroid cancers [61].

RAS mutations are associated with thyroid neoplasms with follicular pattern: 24–53 % of follicular thyroid adenoma (FTA) [62], 40–53 % of FTC [47], and 17–43 % of FVPTC [63–66]. *RAS* mutations have also been reported in 18–27 % of PDC and 20–60 % of UC [47].

The clinical significance of *RAS* mutations in thyroid cancer is controversial. Some reports show that *RAS* mutations are associated with tumour aggressive phenotypes and poor prognosis [67, 68], while others do not confirm this association [50]. *RAS* mutational status is not sensitive or specific enough to support its singular use as a molecular marker for the prediction of benignity or malignancy of thyroid nodules or prognosis [69, 70].

RET/PTC rearrangements are more frequent (45–60 %) in sporadic PTCs of children and young adults [71, 72] and in populations subjected to accidental or therapeutic irradiation

(50–80 %) [73, 74]. Additionally, *RET/PTC* rearrangements have been detected in benign lesions of the thyroid [75], such as Hashimoto thyroiditis [76] and FTA [77].

The presence of *RET/PTC* rearrangements was associated with lymph node metastasis and extrathyroidal extension [78] whereas in others works it has been associated with a better prognosis [79–81]. Other authors did not detect any correlation between the clinico-pathological features of PTC and *RET/PTC* rearrangement [82]. Given the contradictory findings, the presence of the rearrangement in inflammatory and benign lesions and the low prevalence of *RET/PTC* rearrangements in sporadic thyroid cancer, almost everybody agrees that *RET/PTC* utility as a prognostic biomarker is low [56]. Nevertheless, the presence of this rearrangement in follicular Hürthle cell carcinoma (FHCC) with a solid growth pattern [83] raises the possibility of its utilization as predictive indicator for using RET inhibitors therapy.

PAX8-PPARG rearrangement is detected in sporadic follicular thyroid tumours: FTA (0–55 %), FTC (0–63 %), FVPTC (0–38 %) and in FHCC (0–4 %) [63, 84–87]. Conversely, *PAX8-PPARG* rearrangement has not been described in classical PTC, PDC or UC [87, 88].

PAX8-PPARG rearrangement has been significantly associated with multifocality of the tumours and vascular invasion [63, 86], putatively conferring invasive potential to FTC [89]. Other reports showed that FTC patients with negative expression of PPARG protein presented more poorly differentiated areas and were more likely to have metastatic disease [90, 91]. Despite this evidences the consistent detection of *PAX8-PPARG* in benign tumours restricts its value as a diagnostic molecular marker.

Recently, *TERT* promoter mutations were detected in PTC, FTC, PDC and UC and were found to be associated with characteristics of guarded prognosis in DTC (older age, bigger tumours and presence of metastases) [92]. Our preliminary data also indicate that patients harbouring *TERT* promoter mutations show a poorer outcome (unpublished observations). Further studies with larger series are necessary to see whether

or not such mutations do constitute a good molecular marker for prognostic proposes.

Genetic markers on FNAB

Besides the difficulty in getting accurate diagnostic/prognostic indicators, a substantial number of surgeries of benign nodules is performed due to the diagnostic limitations of FNAB [93]. Acknowledging these limitations, several researchers and companies have been testing molecular markers alone and/or in combination, in order to identify malignant thyroid tumours in cases of uncertain diagnosis or indeterminate FNAB.

The diagnostic performance of combined molecular markers (*BRAF* and *RAS* mutations, and *RET/PTC* and *PAX8/PPARG* rearrangements) has been evaluated together with cytopathology in the FNAB setting. The combination of FNAB cytological examination and molecular analysis increase, in some studies, the diagnostic accuracy to 96 % [94, 95], but these results remain to be confirmed by other groups.

Through a meta-analysis of the molecular markers used in FNAB, Xing et al. proposed an algorithm that includes cytology and genetic analysis in the pre-surgical management of patients with thyroid nodules [96]. These authors claim that this analysis will avoid unnecessary surgery of patients with molecular profile of "indolent" thyroid nodules highlighting the benign behaviour of the tumour.

Several molecular diagnostic tests are now available on the market either to exclude potential malignancy of thyroid tumours — Afirma Gene Expression Classifier (GEC) [97], or to diagnose malignancy — 4-gene classifier [94, 95]. One study using GEC test showed that surgery might have been avoided in 41 % of the patients with uncertain diagnosis by FNAB, based on the benign profile provided by GEC [98]. These tests can help in specific settings to achieve better decisions on patients' treatment.

In microarray analysis, several other well-known or still uncharacterized genes have been described as cancer markers in thyroid tumours [99], but its usefulness as prognostic factors has not been explored to date. Additionally, a microarray analysis performed in microPTC and PTC (>1 cm) revealed no differences in gene expression between the two entities [100], suggesting that the differential gene expression could not predict the progression of such thyroid tumours, and thus reducing its use as prognostic maker (Table 2).

Similarly, differential microRNA (miRNA) expression has been tested in thyroid tumours, in an attempt to distinguish benign from malignant tumours [101]. The relative stability and specificity of miRNA expression indicates that miRNAs can be useful for diagnostic purposes [102, 103] but there are no robust data indicating its value in the prognosis of the patients (Table 4).

Conclusions

Clinical and histopathological prognostic factors remain the only safe elements to be used for diagnosis and prognosis of patients with thyroid tumours in "real life". Despite the huge amount of genetic information and the more and more sophisticated and sensitive methodologies used for the characterization of thyroid tumours, very few new markers reveal diagnostic or prognostic value per se. Some of them (like the *BRAF* mutation) can have some value if associated to other clinico-pathological parameters, or in the particular setting of iodine refractory tumours. Others can prove interesting in the (near?) future as predictive biomarkers of therapeutic response. Finally, other markers like *TERT* promoter mutations have recently emerge as promising prognostic markers, but only the study of large series with lengthy follow-up will be able to confirm this assumption.

Acknowledgments This work was supported by Portuguese Foundation for Science and Technology by the project: "Microenvironment, metabolism and cancer" partially supported by Programa Operacional Regional do Norte (ON.2-O Novo Norte) under the Quadro de Referencia Estrategico Nacional (QREN) and through the Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Conflict of interest No competing financial interest exists.

References

- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR (1998) A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985–1995 [see comments]. *Cancer* 83(12):2638–2648. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19981215)83:12<2638::AID-CNCR31>3.0.CO;2-1
- Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR (1997) Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973–1991. *Cancer* 79(3):564–573
- Elisei R, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Masserini L, Ceccarelli C, Lippi F, Grasso L, Basolo F, Bevilacqua G, Miccoli P, Di Coscio G, Vitti P, Pacini F, Pinchera A (2010) Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. *J Clin Endocrinol Metab* 95(4):1516–1527. doi:10.1210/jc.2009-1536
- Russell MA, Gilbert EF, Jaeschke WF (1975) Prognostic features of thyroid cancer. A long-term followup of 68 cases. *Cancer* 36(2):553–559
- Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, Maurer MS, McIver B, Mullan BP, Oberg AL, Powell CC, van Heerden JA, Goellner JR (2002) Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940–1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg* 26(8):879–885. doi:10.1007/s00268-002-6612-1
- Leboulleux S, Hartl D, Baudin E, Schlumberger M (2012) Differentiated thyroid cancer in childhood. *Bull du Cancer* 99(11):1093–1099. doi:10.1684/bdc.2012.1645

7. Schlumberger M, Challeton C, De Vathaire F, Travagli JP, Gardet P, Lumbroso JD, Francese C, Fontaine F, Ricard M, Parmentier C (1996) Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastases from thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 37(4):598–605
8. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *Ca: A Cancer J Clin* 62(1):10–29. doi:10.3322/caac.20138
9. Kilfoy BA, Devesa SS, Ward MH, Zhang Y, Rosenberg PS, Holford TR, Anderson WF (2009) Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(4):1092–1100. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0976
10. Nilubol N, Zhang L, Kebebew E (2013) Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. *Thyroid* 23(6):695–702. doi:10.1089/thy.2012.0269
11. Mazeh H, Sippel RS (2013) Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. doi:10.1089/thy.2013.0079
12. Uchino S, Noguchi S, Kawamoto H, Yamashita H, Watanabe S, Yamashita H, Shuto S (2002) Familial nonmedullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. *World J Surg* 26(8):897–902. doi:10.1007/s00268-002-6615-y
13. Mazeh H, Benavidez J, Poehls JL, Youngwirth L, Chen H, Sippel RS (2012) In patients with thyroid cancer of follicular cell origin, a family history of nonmedullary thyroid cancer in one first-degree relative is associated with more aggressive disease. *Thyroid* 22(1):3–8. doi:10.1089/thy.2011.0192
14. Robenshtok E, Tzvetov G, Grozinsky-Glasberg S, Shraga-Slutsky I, Weinstein R, Lazar L, Serov S, Singer J, Hirsch D, Shimon I, Benbassat C (2011) Clinical characteristics and outcome of familial nonmedullary thyroid cancer: a retrospective controlled study. *Thyroid* 21(1):43–48. doi:10.1089/thy.2009.0406
15. Ito Y, Kakudo K, Hirokawa M, Fukushima M, Yabuta T, Tomoda C, Inoue H, Kihara M, Higashiyama T, Urino T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyachi A (2009) Biological behavior and prognosis of familial papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 145(1):100–105. doi:10.1016/j.surg.2008.08.004
16. Cunha LL, Ferreira RC, Marcello MA, Vassallo J, Ward LS (2011) Clinical and pathological implications of concurrent autoimmune thyroid disorders and papillary thyroid cancer. *J Thyroid Res* 2011:387062. doi:10.4061/2011/387062
17. Dvorkin S, Robenshtok E, Hirsch D, Strenov Y, Shimon I, Benbassat CA (2013) Differentiated thyroid cancer is associated with less aggressive disease and better outcome in patients with coexisting Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 98(6):2409–2414. doi:10.1210/jc.2013-1309
18. Belfiore A, Russo D, Vigneri R, Filetti S (2001) Graves' disease, thyroid nodules and thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55(6):711–718
19. Pellegriti G, Mannarino C, Russo M, Terranova R, Marturano I, Vigneri R, Belfiore A (2013) Increased mortality in patients with differentiated thyroid cancer associated with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 98(3):1014–1021. doi:10.1210/jc.2012-2843
20. McLeod DS, Watters KF, Carpenter AD, Ladenson PW, Cooper DS, Ding EL (2012) Thyrotropin and thyroid cancer diagnosis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 97(8):2682–2692. doi:10.1210/jc.2012-1083
21. McLeod DS, Cooper DS, Ladenson PW, Ain KB, Brierley J, Fein HG, Haugen BRM, Jonklaas J, Magner J, Ross DD, Young MSM, Seward D, Maxon H, Sherman SI (2013) Prognosis of differentiated thyroid cancer in relation to serum TSH and thyroglobulin antibody status at time of diagnosis. *Thyroid*. doi:10.1089/thy.2013.0062
22. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS, Sturgeon C (2007) Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Ann Surg* 246(3):375–381. doi:10.1097/SLA.0b013e31814697d9, discussion 381–374
23. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM (2009) Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19(11):1167–1214. doi:10.1089/thy.2009.0110
24. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W (2006) European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 154(6):787–803. doi:10.1530/eje.1.02158
25. Bonnet S, Hartl D, Leboulleux S, Baudin E, Lumbroso JD, Al Ghuzlan A, Chami L, Schlumberger M, Travagli JP (2009) Prophylactic lymph node dissection for papillary thyroid cancer less than 2 cm: implications for radioiodine treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 94(4):1162–1167. doi:10.1210/jc.2008-1931
26. Roh JL, Park JY, Park CI (2007) Total thyroidectomy plus neck dissection in differentiated papillary thyroid carcinoma patients: pattern of nodal metastasis, morbidity, recurrence, and postoperative levels of serum parathyroid hormone. *Ann Surg* 245(4):604–610. doi:10.1097/01.sla.0000250451.59685.67
27. Lang BH, Ng SH, Lan L, Cowling B, Wong KP, Wan KY (2013) A systematic review and meta-analysis of prophylactic central neck dissection on short-term locoregional recurrence in papillary thyroid carcinoma after total thyroidectomy. *Thyroid*. doi:10.1089/thy.2012.0608
28. Webb RC, Howard RS, Stojadinovic A, Gaitonde DY, Wallace MK, Ahmed J, Burch HB (2012) The utility of serum thyroglobulin measurement at the time of remnant ablation for predicting disease-free status in patients with differentiated thyroid cancer: a meta-analysis involving 3947 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 97(8):2754–2763. doi:10.1210/jc.2012-1533
29. Melo M, Costa G, Ribeiro C, Carrilho F, Martins MJ, da Rocha AG, Sobrinho-Simoes M, Carvalheiro M, Soares P (2013) Stimulated thyroglobulin at recombinant human TSH-aided ablation predicts disease-free status one year later. *J Clin Endocrinol Metab* 98(11):4364–4372. doi:10.1210/jc.2013-2267
30. Robenshtok E, Grewal RK, Fish S, Sabra M, Tuttle RM (2013) A low postoperative nonstimulated serum thyroglobulin level does not exclude the presence of radioactive iodine avid metastatic foci in intermediate-risk differentiated thyroid cancer patients. *Thyroid* 23(4):436–442. doi:10.1089/thy.2012.0352
31. Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM (1987) Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 102(6):1088–1095
32. Cady B (1998) Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition. *Surg Oncol Clin N Am* 7(4):633–644
33. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS (1993) 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* 114(6):1050–1057, discussion 1057–1058
34. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH (1990) Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 71(2):414–424
35. Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, Cooper DS, Haugen BR, Ho M, Klein I, Ladenson PW, Robbins J, Ross DS, Specker B, Taylor T, Maxon HR 3rd (1998) Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer* 83(5):1012–1021
36. Verburg FA, Mader U, Kruitwagen CL, Luster M, Reiners C (2010) A comparison of prognostic classification systems for differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 72(6):830–838. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03734.x

37. Eloy C, Santos J, Soares P, Sobrinho-Simoes M (2011) The pre-eminence of growth pattern and invasiveness and the limited influence of BRAF and RAS mutations in the occurrence of papillary thyroid carcinoma lymph node metastases. *Virchows Arch* 459(3):265–276. doi:10.1007/s00428-011-1133-7
38. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (2004) WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. IARC Press, Lyon
39. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis R (1992) Tumors of the thyroid gland: atlas of tumor pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC
40. Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M (1994) Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology* 24(3):205–210
41. Soares P, Lima J, Preto A, Castro P, Vinagre J, Celestino R, Couto JP, Prazeres H, Eloy C, Maximo V, Sobrinho-Simoes M (2011) Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Curr Genomics* 12(8):609–617. doi:10.2174/138920211798120853
42. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD (1994) Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med* 154(16):1838–1840
43. Papini E, Guglielmi R, Gharib H, Misischi I, Graziano F, Chianelli M, Crescenzi A, Bianchini A, Valle D, Bizzarri G (2011) Ultrasound-guided laser ablation of incidental papillary thyroid microcarcinoma: a potential therapeutic approach in patients at surgical risk. *Thyroid* 21(8):917–920. doi:10.1089/thy.2010.0447
44. Brown RL, de Souza JA, Cohen EE (2011) Thyroid cancer: burden of illness and management of disease. *J Cancer* 2:193–199
45. Mazzaferri EL, Jhiang SM (1994) Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 97(5):418–428
46. Xing M (2013) Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 13(3):184–199. doi:10.1038/nrc3431
47. Kondo T, Ezzat S, Asa SL (2006) Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6(4):292–306. doi:10.1038/nrc1836
48. Xing M (2005) BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrinol Relat Cancer* 12(2):245–262. doi:10.1677/erc.1.0978
49. 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 (2003) BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88(11):5399–5404
50. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, Ghossein RA, Fagin JA (2009) Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* 69(11):4885–4893. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0727
51. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijao T, Rebocho AP, Fonseca E, Vieira de Castro I, Cameselle-Teijeiro J, Cardoso-Oliveira M, Sobrinho-Simoes M (2004) BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Arch* 444(6):572–576. doi:10.1007/s00428-004-1018-0
52. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, Kim KW, Hahn SK, Youn YK, Kim KH, Cho BY, Park do J (2012) The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer* 118(7):1764–1773. doi:10.1002/cncr.26500
53. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, Yip L, Mian C, Vianello F, Tuttle RM, Robenshtok E, Fagin JA, Puxeddu E, Fugazzola L, Czarniecka A, Jarzab B, O'Neill CJ, Sywak MS, Lam AK, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, Nakayama H, Tufano RP, Pai SI, Zeiger MA, Westra WH, Clark DP, Clifton-Bligh R, Sidransky D, Ladenson PW, Sykora V (2013) Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA* 309(14):1493–1501. doi:10.1001/jama.2013.3190
54. Xing M (2010) Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 321(1):86–93. doi:10.1016/j.mce.2009.10.012
55. Soares P, Sobrinho-Simoes M (2011) Cancer: small papillary thyroid cancers—is BRAF of prognostic value? *Nat Rev Endocrinol* 7(1):9–10. doi:10.1038/nrendo.2010.213
56. Patel KN (2013) Genetic mutations, molecular markers and future directions in research. *Oral Oncol* 49(7):711–721. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.03.437
57. Mian C, Barollo S, Pennelli G, Pavan N, Rugge M, Pelizzo MR, Mazzarotto R, Casara D, Nacamulli D, Mantero F, Opocher G, Busnardo B, Girelli ME (2008) Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no 131I uptake. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68(1):108–116. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.03008.x
58. Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P (2006) The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocrinol Relat Cancer* 13(1):257–269. doi:10.1677/erc.1.01119
59. Sabra MM, Dominguez JM, Grewal RK, Larson SM, Ghossein RA, Tuttle RM, Fagin JA (2013) Clinical outcomes and molecular profile of differentiated thyroid cancers with radioiodine-avid distant metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 98(5):E829–E836. doi:10.1210/jc.2012-3933
60. Liu D, Hu S, Hou P, Jiang D, Condouris S, Xing M (2007) Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. *Clin Cancer Res* 13(4):1341–1349. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1753
61. Chakravarty D, Santos E, Ryder M, Knauf JA, Liao XH, West BL, Bollag G, Kolesnick R, Thin TH, Rosen N, Zanzonico P, Larson SM, Refetoff S, Ghossein R, Fagin JA (2011) Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest* 121(12):4700–4711. doi:10.1172/JCI46382
62. Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, Soares P (2005) Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 447(5):787–793. doi:10.1007/s00428-005-0065-5
63. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simoes M (2006) PAX8-PPARGamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91(1):213–220
64. Di Cristofaro J, Marcy M, Vasko V, Sebarg F, Fakhry N, Wynford-Thomas D, De Micco C (2006) Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. *Hum Pathol* 37(7):824–830. doi:10.1016/j.humpath.2006.01.030
65. Santarpia L, Myers JN, Sherman SI, Trimarchi F, Clayman GL, El-Naggar AK (2010) Genetic alterations in the RAS/RAF/mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 116(12):2974–2983. doi:10.1002/cncr.25061
66. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE (2003) Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 120(1):71–77

67. Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, Nikiforov YE (2009) RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. *J Clin Endocrinol Metab* 94(12):4735–4741. doi:10.1210/jc.2009-1233
68. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G (2003) ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 21(17):3226–3235. doi:10.1200/JCO.2003.10.130
69. Xing M (2010) Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 20(7):697–706. doi:10.1089/thy.2010.1646
70. Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE (1999) Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50(4):529–535
71. Bongarzoni I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, Basolo F, Pinchera A, Pilotti S, Pierotti MA (1996) Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81(5):2006–2009
72. Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM (2000) The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 85(3):1170–1175
73. Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M, Suarez HG (1997) High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* 15(11):1263–1273. doi:10.1038/sj.onc.1200206
74. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorov JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S (2000) Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 6(3):1093–1103
75. Elisei R, Romei C, Vrontosova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P, Pinchera A, Pacini F (2001) RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 86(7):3211–3216
76. Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, Qumsiyeh MB, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Zitzelsberger H, Tallini G (2006) RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91(6):2414–2423
77. Ishizaka Y, Kobayashi S, Ushijima T, Hirohashi S, Sugimura T, Nagao M (1991) Detection of ret/PTC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method. *Oncogene* 6(9):1667–1672
78. Sassolas G, Hafidi-Nejjari Z, Ferraro A, Decaussin-Petrucci M, Rousset B, Borson-Chazot F, Borbone E, Berger N, Fusco A (2012) Oncogenic alterations in papillary thyroid cancers of young patients. *Thyroid* 22(1):17–26. doi:10.1089/thy.2011.0215
79. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE (2006) Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 30(2):216–222
80. Santoro M, Melillo RM, Fusco A (2006) RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol* 155(5):645–653. doi:10.1530/eje.1.02289
81. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simoes M (1998) Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 185(1):71–78
82. Puxeddu E, Moretti S, Giannico A, Martinelli M, Marino C, Avena N, Cristofani R, Farabi R, Reboldi G, Ribacchi R, Pontecorvi A, Santeusano F (2003) Ret/PTC activation does not influence clinical and pathological features of adult papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol* 148(5):505–513
83. de Vries MM, Celestino R, Castro P, Eloy C, Maximo V, van der Wal JE, Plukker JT, Links TP, Hofstra RM, Sobrinho-Simoes M, Soares P (2012) RET/PTC rearrangement is prevalent in follicular Hurthle cell carcinomas. *Histopathology*. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04276.x
84. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA (2000) PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289 (5483):1357–1360. doi:8756 [pii]
85. Marques AR, Espadilha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V (2002) Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87(8):3947–3952
86. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE (2002) PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 26(8):1016–1023
87. Placzkowski KA, Reddi HV, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B (2008) The role of the PAX8/PPARgamma fusion oncogene in thyroid cancer. *PPAR Res* 2008:672829. doi:10.1155/2008/672829
88. Sobrinho-Simoes M, Maximo V, Rocha AS, Trivisio V, Castro P, Preto A, Lima J, Soares P (2008) Intragenic mutations in thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin N Am* 37(2):333–362. doi:10.1016/j.eccl.2008.02.004
89. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dom GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE (2003) RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2318–2326
90. Marques AR, Espadilha C, Frias MJ, Roque L, Catarino AL, Sobrinho LG, Leite V (2004) Underexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in PAX8/PPARgamma-negative thyroid tumours. *Br J Cancer* 91(4):732–738. doi:10.1038/sj.bjc.6601989
91. Sahin M, Allard BL, Yates M, Powell JG, Wang XL, Hay ID, Zhao Y, Goellner JR, Sebo TJ, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B (2005) PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 90(1):463–468. doi:10.1210/jc.2004-1203
92. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M, Lima J, Maximo V, Soares P (2013) Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun* 4:2185. doi:10.1038/ncomms3185
93. Daniels GH (2013) What is the role of molecular markers in the management of "indeterminate" thyroid nodules? *Cancer Cytopathol* 121(5):223–224. doi:10.1002/ency.21289
94. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopffer JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN (2009) Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 94(6):2092–2098. doi:10.1210/jc.2009-0247
95. Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, Di Santo A, Caruso G, Carli AF, Brilli L, Montanaro A, Pacini F (2010) Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of

- cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 95(3):1365–1369. doi:10.1210/jc.2009-2103
96. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M (2013) Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet* 381(9871):1058–1069. doi:10.1016/S0140-6736(13)60109-9
 97. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, Friedman L, Kloos RT, LiVolsi VA, Mandel SJ, Raab SS, Rossi J, Steward DL, Walsh PS, Wilde JI, Zeiger MA, Lanman RB, Haugen BR (2012) Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med* 367(8):705–715. doi:10.1056/NEJMoa1203208
 98. Rhee CM, Alexander EK, Bhan I, Brunelli SM (2013) Hypothyroidism and mortality among dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* : CJASN 8(4):593–601. doi:10.2215/CJN.06920712
 99. Griffith OL, Melck A, Jones SJ, Wiseman SM (2006) Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. *J Clin Oncol* 24(31):5043–5051. doi:10.1200/JCO.2006.06.7330
 100. Kim HY, Park WY, Lee KE, Park WS, Chung YS, Cho SJ, Youn YK (2010) Comparative analysis of gene expression profiles of papillary thyroid microcarcinoma and papillary thyroid carcinoma. *J Cancer Res Ther* 6(4):452–457. doi:10.4103/0973-1482.77103
 101. Zhang X, Mao H, Lv Z (2013) MicroRNA role in thyroid cancer pathogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18:734–739
 102. Eszlinger M, Krohn K, Hauptmann S, Dralle H, Giordano TJ, Paschke R (2008) Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93(9):3286–3294. doi:10.1210/jc.2008-0201
 103. Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A (2010) Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocrinol Relat Cancer* 17(1):F91–F104. doi:10.1677/ERC-09-0217
 104. Pinto AE, Silva G, Banito A, Leite V, Soares J (2008) Aneuploidy and high S-phase as biomarkers of poor clinical outcome in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinoma. *Oncol Reports* 20(4):913–919
 105. Bohm J, Niskanen L, Kiraly K, Kellokoski J, Eskelinen M, Hollmen S, Alhava E, Kosma VM (2000) Expression and prognostic value of alpha-, beta-, and gamma-catenins in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4806–4811
 106. Wiseman SM, Griffith OL, Deen S, Rajput A, Masoudi H, Gilks B, Goldstein L, Gown A, Jones SJ (2007) Identification of molecular markers altered during transformation of differentiated into anaplastic thyroid carcinoma. *Arch Surg* 142(8):717–727. doi:10.1001/archsurg.142.8.717, discussion 727–719
 107. 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 (2012) 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* 97(12):4390–4398. doi:10.1210/jc.2012-1775
 108. Fernandez JJ, Piccin O, Sciascia S, Cavicchi O, Repaci A, Vicennati V, Fiorentino M (2013) Clinical significance of BRAF mutation in thyroid papillary cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* : Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg 148(6):919–925. doi:10.1177/0194599813481942
 109. Kim SJ, Lee KE, Myong JP, Park JH, Jeon YK, Min HS, Park SY, Jung KC, Koo do H, Youn YK (2012) BRAF V600E mutation is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer. *World J Surg* 36(2):310–317. doi:10.1007/s00268-011-1383-1
 110. Ricarte J, Ganly I, Rivera M, Katabi N, Fu WM, Shaha A, Tuttle RM, Fagin JA, Ghossein R (2012) Papillary thyroid carcinomas with cervical lymph node metastases can be stratified into clinically relevant prognostic categories using oncogenic BRAF, the number of nodal mMetastases, and extra-nodal extension. *Thyroid* 22(6):575–584. doi:10.1089/thy.2011.0431
 111. Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Lombardi CP, Pontecorvi A, Vellone VG, Zannoni GF, Larocca LM, Fadda G (2013) BRAF (V600E) mutation analysis on liquid-based cytology-processed aspiration biopsies predicts bilaterality and lymph node involvement in papillary thyroid microcarcinoma. *Cancer Cytopathol* 121(6):291–297. doi:10.1002/cncy.21258
 112. Tufano RP, Bishop J, Wu G (2012) Reoperative central compartment dissection for patients with recurrent/persistent papillary thyroid cancer: efficacy, safety, and the association of the BRAF mutation. *Laryngoscope* 122(7):1634–1640. doi:10.1002/lary.23371
 113. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G (2001) 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* 158(3):987–996
 114. So AK, Kaur J, Kak I, Assi J, MacMillan C, Ralhan R, Walfish PG (2012) Biotinidase is a novel marker for papillary thyroid cancer aggressiveness. *PLoS one* 7(7):e40956. doi:10.1371/journal.pone.0040956
 115. Liu Z, Liu D, Bojdani E, El-Naggar AK, Vasko V, Xing M (2010) IQGAP1 plays an important role in the invasiveness of thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 16(24):6009–6018. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1627
 116. Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL (2000) Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 53(5):635–644
 117. Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G (2012) COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients from northeast Chinese population—result of a single-center study. *Int J Med Sci* 9(3):237–242. doi:10.7150/ijms.4173
 118. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL (1994) N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 116(6):1010–1016
 119. Sheils OM, O'Leary JJ, Sweeney EC (2000) Assessment of ret/PTC-1 rearrangements in neoplastic thyroid tissue using TaqMan RT-PCR. *J Pathol* 192(1):32–36. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH668<3.0.CO;2-F
 120. Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL (1999) Oncogene profile of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 125(1):46–52
 121. Wagner PL, Moo TA, Arora N, Liu YF, Zarnegar R, Scognamiglio T, Fahey TJ 3rd (2008) The chemokine receptors CXCR4 and CCR7 are associated with tumor size and pathologic indicators of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol* 15(10):2833–2841. doi:10.1245/s10434-008-0064-2
 122. Khoo ML, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL (2002) Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification. *J Clin Endocrinol Metab* 87(4):1810–1813
 123. Pesutic-Pisac V, Punda A, Gluncic I, Bedekovic V, Pranik-Kragic A, Kunac N (2008) Cyclin D1 and p27 expression as prognostic factor in papillary carcinoma of thyroid: association with clinicopathological parameters. *Croatian Med J* 49(5):643–649
 124. Brecej E, Frkovic Grazio S, Auersperg M, Bracko M (2005) Prognostic value of E-cadherin expression in thyroid follicular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* : J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol 31(5):544–548. doi:10.1016/j.ejso.2005.02.003
 125. von Wasielewski R, Rhein A, Werner M, Scheumann GF, Dralle H, Potter E, Brabant G, Georgii A (1997) Immunohistochemical

- detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 57(12):2501–2507
126. Akslen LA, Varhaug JE (1995) Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma: presence of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein, estrogen receptor related protein, p21-ras protein, and proliferation indicators in relation to tumor recurrences and patient survival. *Cancer* 76(9):1643–1654
 127. Oler G, Camacho CP, Hojaij FC, Michaluart P Jr, Riggins GJ, Cerutti JM (2008) Gene expression profiling of papillary thyroid carcinoma identifies transcripts correlated with BRAF mutational status and lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 14(15):4735–4742. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4372
 128. He HC, Kashat L, Kak I, Kunavisarut T, Gundelach R, Kim D, So AK, MacMillan C, Freeman JL, Ralhan R, Walfish PG (2012) An Ep-ICD based index is a marker of aggressiveness and poor prognosis in thyroid carcinoma. *PLoS one* 7(9):e42893. doi:10.1371/journal.pone.0042893
 129. Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS (2012) Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)* 67(5):483–488
 130. Williams MD, Zhang L, Elliott DD, Perrier ND, Lozano G, Clayman GL, El-Naggar AK (2011) Differential gene expression profiling of aggressive and nonaggressive follicular carcinomas. *Hum Pathol* 42(9):1213–1220. doi:10.1016/j.humpath.2010.12.006
 131. Pita JM, Banito A, Cavaco BM, Leite V (2009) Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 101(10):1782–1791. doi:10.1038/sj.bjc.6605340
 132. Kremser R, Obrist P, Spizzo G, Ertler H, Kendlr D, Kemmler G, Mikuz G, Ensinger C (2003) Her2/neu overexpression in differentiated thyroid carcinomas predicts metastatic disease. *Virchows Arch* 442(4):322–328. doi:10.1007/s00428-003-0769-3
 133. Ruan DT, Warren RS, Moalem J, Chung KW, Griffin AC, Shen W, Duh QY, Nakakura E, Donner DB, Khanafshar E, Weng J, Clark OH, Kebebew E (2008) Mitogen-inducible gene-6 expression correlates with survival and is an independent predictor of recurrence in BRAF(V600E) positive papillary thyroid cancers. *Surgery* 144(6):908–913. doi:10.1016/j.surg.2008.07.028, discussion 913–904
 134. Wreesmann VB, Sieczka EM, Soggi ND, Hezel M, Belbin TJ, Childs G, Patel SG, Patel KN, Tallini G, Prystowsky M, Shaha AR, Kraus D, Shah JP, Rao PH, Ghossein R, Singh B (2004) Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. *Cancer Res* 64(11):3780–3789. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-1460
 135. Asioli S, Erickson LA, Righi A, Jin L, Volante M, Jenkins S, Papotti M, Bussolati G, Lloyd RV (2010) Poorly differentiated carcinoma of the thyroid: validation of the Turin proposal and analysis of IMP3 expression. *Mod pathol : Off J US Can Acad Pathol, Inc* 23(9):1269–1278. doi:10.1038/modpathol.2010.117
 136. Zou M, Al-Baradie RS, Al-Hindi H, Farid NR, Shi Y (2005) S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 93(11):1277–1284. doi:10.1038/sj.bjc.6602856
 137. Tian X, Cong M, Zhou W, Zhu J, Liu Q (2008) Relationship between protein expression of VEGF-C, MMP-2 and lymph node metastasis in papillary thyroid cancer. *J Int Med Res* 36(4):699–703
 138. Gerhard R, Nonogaki S, Fregnani JH, Soares FA, Nagai MA (2010) NDRG1 protein overexpression in malignant thyroid neoplasms. *Clinics (Sao Paulo)* 65(8):757–762
 139. Guarino V, Faviana P, Salvatore G, Castellone MD, Cirafici AM, De Falco V, Celetti A, Giannini R, Basolo F, Melillo RM, Santoro M (2005) Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness. *J Clin Endocr Metab* 90(9):5270–5278. doi:10.1210/jc.2005-0271
 140. Melck A, Masoudi H, Griffith OL, Rajput A, Wilkins G, Bugis S, Jones SJ, Wiseman SM (2007) Cell cycle regulators show diagnostic and prognostic utility for differentiated thyroid cancer. *Ann Surg Oncol* 14(12):3403–3411. doi:10.1245/s10434-007-9572-8
 141. Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, Nikiforova MN (2011) MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18(7):2035–2041. doi:10.1245/s10434-011-1733-0
 142. Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF, Yang KD, Cheng JT, Huang CC, Liu RT (2010) miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. *Thyroid* 20(5):489–494. doi:10.1089/thy.2009.0027
 143. Chou CK, Yang KD, Chou FF, Huang CC, Lan YW, Lee YF, Kang HY, Liu RT (2013) Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 98(2):E196–E205. doi:10.1210/jc.2012-2666
 144. Basolo F, Pinchera A, Fugazzola L, Fontanini G, Elisei R, Romei C, Pacini F (1994) Expression of p21 ras protein as a prognostic factor in papillary thyroid cancer. *Eur J Cancer* 30A(2):171–174
 145. Zafon C, Obiols G, Castellvi J, Tallada N, Baena JA, Simo R, Mesa J (2007) Clinical significance of RET/PTC and p53 protein expression in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 50(2):225–231. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02555.x
 146. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, Lee HJ, Sul JY, Kweon GR, Ro HK, Kim JM, Shong M (2006) Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91(9):3667–3670. doi:10.1210/jc.2005-2836
 147. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plenat F, Leclere J, Duprez A, Weryha G (2001) Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 86(2):656–658

8.2. – Licença de direitos de utilização de imagem

Em anexo apresenta-se a licença dos direitos de utilização da Figura 1.

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 17, 2014

This is a License Agreement between Miguel Melo ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3391540056686
License date	May 17, 2014
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Endocrinology
Licensed content title	Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer
Licensed content author	Yuri E. Nikiforov and Marina N. Nikiforova
Licensed content date	Oct 1, 2011
Volume number	7
Issue number	10
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 2 - The main signaling pathways involved in thyroid carcinogenesis are the MAPK and PI3K-AKT pathways
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Molecular markers of prognosis and therapeutic selection in differentiated thyroid tumors
Expected completion date	Jul 2014
Estimated size (number of pages)	60
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line

applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number 501305359. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
