



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO V600E DO GENE *BRAF* EM
MICROCARCINOMA PAPILAR DE TIREÓIDE**

ANTÔNIO PAULO MACHADO GONTIJO

GOIÂNIA-GO

2012

ANTÔNIO PAULO MACHADO GONTIJO

**ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO V600E DO GENE BRAF EM
MICROCARCINOMA PAPILAR DE TIREÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Vera Aparecida Saddi

CO-ORIENTADOR: Prof^o. Dr. José Carlos de Oliveira

GOIÂNIA-GO

2012

G641a

Gontijo, Antonio Paulo Machado.

Análise molecular da mutação V600E do gene BRAF em microcarcinoma papilar de tireóide [manuscrito] / Antonio Paulo Machado Gontijo. – 2012.

57 f. : il. tabs.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Vera Aparecida Saddi.

Co-orientador: Prof^o. Dr. José Carlos de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Genética, 2012.

Bibliografia.

Inclui listas de figuras, tabelas, anexos, símbolos, abreviaturas, siglas.

1. Carcinoma papilar – Tireóide. 2. Câncer – Genética. 3. Câncer – Mutação – Gene BRAF. 4. Microcarcinoma – BRAF. I. Título.

CDU: 616-006/612.44:616.448

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BANCA EXAMINADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno(a): Antônio Paulo Machado Gontijo

Orientador(a): Prof^a. Dra. Vera Aparecida Saddi

Membros:

Prof^a. Dra. Rejane da Silva Sena Barcelos

Prof^o. Dr. Wilmar José Manoel

Prof^o. Dr. Antonio Marcio Teodoro Cordeiro Silva

Data: 29/08/2012

AGRADECIMENTOS

*“Mesmo que já tenha feito uma longa caminhada,
sempre haverá um caminho a percorrer”
Santo Agostinho*

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras para enriquecer com sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras para serem edificadas, e isso é prudência; outras desejam sabedoria para edificarem os outros, e isso é sublime”.

Essa reflexão de Santo Agostinho espelha o que faz a minha professora, Dra. Vera Saddi; _ Obrigado pelos pilares que colocou nesse teu aluno!

Agradeço especialmente ao Dr. José Carlos, que contribuiu muito com orientações, sugestões e correções. Obrigado!

Dos colegas Dr. Waldyr Quinta, Dr. José Carlos, Dr. Mácio Roberto, Dr. Renato Aguiar e Dr. Taylor Gerhardt recebi sempre a amizade e o estímulo. Também do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Araujo Jorge, agradeço o Dr. Alexandre; sua companhia em boa parte desse mestrado, assistindo as aulas, compartilhando idéias, me fez muitas vezes esquecer o cansaço e ter ânimo para continuar.

Aos Dr. Élbio de Paula, pela disposição e ensinamentos. Na sua pessoa agradeço aos outros patologistas do Setor de Anatomia Patológica (HAJ).

Minha mãe Ana Braga e meu pai, Trajano: a vocês devo a vida e o exemplo de retidão de caráter e de trabalho.

Foi inestimável a colaboração de dois pesquisadores cuja idade parece não pairar com o sólido conhecimento no seara da biologia molecular; muito obrigado Caio Bruno e Brhuna!!

Agradeço também aos Doutores Wilmar José Manoel, Rejane da Silva Sena Barcelos e Antonio Marcio Teodoro Cordeiro Silva por aceitarem fazer parte da Banca Examinadora desse mestrado.

Faço aqui uma homenagem à memória de Adriana Monteiro Gontijo.

Dedico esse mestrado a

Ana Maria

Ana Paula

José Augusto e

Rodrigo

RESUMO

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna endócrina mais comum, com incidência crescente em todo o mundo. Esse crescimento é quase que exclusivamente às custas do carcinoma papilar da tireóide (CPT) e, atualmente, 30-50% desses tumores são microcarcinomas papilares de tireóide (MCPT). Os diversos sistemas de estratificação para classificação desses pacientes em baixo e alto risco têm se revelado insatisfatórios, levando à procura de um marcador molecular que possa compor uma estratificação mais efetiva. A mutação V600E do gene *BRAF* constitui um evento genético frequente dos carcinomas papilares da tireóide, refletindo seu potencial como marcador tumoral nos MCPT. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência dessa mutação em 80 espécimes de MCPT, oriundas do Serviço de Patologia do Hospital Araújo Jorge de Goiânia, de pacientes operados entre 1999 a 2006. A análise molecular da mutação V600E do gene *BRAF* foi realizada por meio das técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP). As análises estatísticas incluíram o teste do Qui-quadrado com correção de Yates e o teste exato de Fisher. Dentre os 80 casos de MCPT analisados, 73 (91,2%) eram do sexo feminino; 47 pacientes (58,7%) tinham idades abaixo de 45 anos e 33 (41,3%) tinham idades \geq 45 anos. Metástases linfonodais foram observadas em 28 pacientes (35%) e 19 tumores (23,7%) apresentaram extensão extratiroideana. A mutação V600E do gene *BRAF* foi observada em 50 casos (62,5%). Dentre os parâmetros clínicos e histopatológicos investigados no grupo de pacientes deste estudo, nenhuma associação estatisticamente significativa foi detectada em relação à presença da mutação V600E do gene *BRAF*. Nossos resultados demonstraram que a mutação V600E do gene *BRAF* é uma alteração genética comum nos MCPT, podendo representar um evento precoce na carcinogênese da glândula tireóide. Entretanto, implicações desta mutação no prognóstico dos microcarcinomas papilíferos de tireóide não foram observadas.

Palavras-chave: *BRAF*; mutação V600E; microcarcinoma papilar de tireóide.

ABSTRACT

Thyroid cancer is the commonest endocrine malignancy, with a rising incidence all over the world. This increasing incidence is almost exclusively due to the papillary thyroid cancer (PTC) and 30% to 50% of these tumors are papillary thyroid microcarcinomas (PTMC). The many score systems for risk stratification of these patients in low and high risk have been revealed to be unsatisfactory, leading to the search of a molecular marker which could integrate a more reliable stratification system. *BRAF*^{V600E} mutation is a frequent genetic event in the papillary thyroid carcinomas, that reflects its potential as a molecular marker in the PTMC. The aim of the present study was to evaluate the prevalence of such mutation in 80 paraffin embedded PTMC samples from the Pathology Department of the Hospital Araújo Jorge of Goiânia, Goiás, Brasil, obtained from patients operated between 1999 and 2006. Molecular analysis of the *BRAF*^{V600E} mutation has been achieved by PCR and RFLP techniques. Statistical analysis included Chi-squared test with Yates's correction and Fisher's exact test. From the 80 cases of PTMC analysed, 73 (91.2%) were females, 47 patients (58.7%) were less than 45 years old and 33 (41.3%) were ≥ 45 years old. Lymph node metastasis were observed in 28 patients (35.0%) and extrathyroidal extension occurred in 19 cases (23.7%). Mutation *BRAF*^{V600E} was observed in 50 cases (62.5%). There was no statistically significant association between clinicalpathologic parameters and the presence of the *BRAF*^{V600E}. Our results showed that the *BRAF*^{V600E} is a common genetic alteration in the PTMC, and it may represent an early event in the carcinogenesis of the thyroid gland. However, implications of this mutation in the prognostic of the PTMC were not observed.

Keywords: *BRAF*; V600E mutation; BRAF-protein; thyroid papillary microcarcinoma

FIGURAS E TABELAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 1 - | Esquema ilustrativo da anatomia da tireóide..... | 14 |
| Figura 2 - | Iodação da tireoglobulina | 15 |
| Figura 3 - | Esquema de controle por feed-back do eixo tálamo-hipotálamo- tireóide | 16 |
| Figura 4 - | Fotomicrografia mostrando um microcarcinoma papilar de tiroide..... | 21 |
| Figura 5 - | Classificação de Bethesda para citologia de lesões de tireóide | 24 |
| Figura 6 - | Fotomicrografia apresentando aspectos citológicos de tireóide..... | 24 |
| Figura 7 - | Imagem ultrassonográfica de MCPT em lesão sólido-cística..... | 25 |
| Figura 8 - | Representação esquemática do gene <i>BRAF</i> | 28 |
| Figura 9 - | Representação esquemática mostrando a localização do gene <i>BRAF</i> no cromossomo 7 | 29 |
| Figura 10 - | Esquema da via MAPK com formas selvagens (A) e mutada (B) do <i>BRAF</i> | 30 |
| Figura 11 - | Proteína <i>BRAF</i> | 31 |
| Figura 12 - | Gel mostrando produtos de restrição de gene <i>BRAF</i> | 42 |
| Tabela 1 - | Revisão dos artigos científicos sobre a prevalência da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> em microcarcinomas papilares de tireóide e possíveis associações com fatores clinicopatológicos..... | 33 |
| Tabela 2 - | Descrição dos primers e protocolos de ciclagem usados no ensaio de <i>PCR</i> para amplificação do gene <i>BRAF</i> em amostras de carcinoma papilífero da tireóide..... | 39 |
| Tabela 3 - | Análise descritiva dos pacientes com microcarcinoma papilífero de tiroíde | 41 |
| Tabela 4 - | Análise univariada das possíveis associações entre a mutação V600E do gene <i>BRAF</i> e os aspectos clinicopatológicos dos MCPT..... | 43 |

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| AJCC - | do inglês: <i>American Joint Cancer Commite</i> |
| AFT - | adenoma folicular da tireóide |
| AGES - | sistema de estratificação de risco: idade, gênero, extravasamento, tamanho |
| AMES - | sistema de extratificação de risco: idade, metástase linfonodal, extravasamento, tamanho |
| A-Raf - | isoforma A da proteína Raf |
| BAX8-PPAR γ - | rearranjo entre os genes BAX8 e o oncogene PPARgama |
| BRAF - | isoforma B da proteína Raf |
| <i>BRAF</i> - | homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino v- raf |
| BRAF V600E - | substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600 da proteína BRAF |
| BRAFK601E - | substituição do aminoácido lisina por ácido. glutâmico no códon 601 da proteína BRAF |
| BRAFD638E - | substituição do aminoácido aspartato por ácido glutâmico no códon 638 da proteína BRAF |
| BRAFQ638E - | substituição do aminoácido glutamina por ácio glutâmico no códon 638 |
| BRAFQ638R - | substituição do aminoácido glutamina por arginina no códon 638 |
| CMTF - | câncer medular da tireóide familiar |
| C-Raf - | isoforma C da proteína Raf |
| CAT - | Carcinoma Anaplásico da Tireóide |
| CFT - | Carcinoma Folicular da Tireóide |
| CMT - | Carcinoma Medular da Tireóide |
| CPT - | Carcinoma Papilífero da Tireóide |
| CR1 - | domínio rico em cisteína da proteína RAF |
| CR2 - | domínio rico em serina e treonina da proteína RAF |
| CR3 - | domínio de quinase da proteína RAF |
| C-RAF - | isoforma C da proteína RAF |
| CRD - | domínio rico em cisteína |

| | |
|---------|--|
| DNA - | ácido desoxirribonucleico |
| ERK - | quinase regulada por sinal extracelular |
| H AJ - | Hospital Araújo Jorge |
| HGNC - | Human Gene Nomenclature Committe |
| INCA - | Instituto Nacional do Câncer |
| IkB - | proeinas inibidoras de NF-kB |
| IKK - | IkB Kinase Complex – I kB inibida |
| IKK - | alfa (IKK1)– do inglês: <i>bonafide kinase predominante</i> |
| IKK - | beta (IKK2)- do inglês: <i>bonafide kinase</i> |
| IKK - | gamma (NEMO)- terceira subunidade da I kB, com atividade catalítica |
| KD - | domínio quinase |
| KTR- | do inglês: <i>kinase-tirosin receptor</i> |
| MACIS - | metástase a distância, idade, invasão local, ressecção, citologia |
| MAPK - | via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos |
| MCPT- | microcarcinoma papilar da tireóide |
| MENA - | síndrome endócrina múltipla tipo A |
| MENB - | síndrome endócrina múltipla tipo B |
| MEK - | MAPK/ERK quinase |
| NF-Kb - | fator nuclear kappa B |
| NIS - | proteína trocadora de iodeto e sódio (do inglês: <i>natrium iodide symporter</i>) |
| PAAF - | punção aspirativa com agulha fina |
| pb - | pares de bases |
| PCR - | reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| pH - | potencial hidrogeniônico |
| r.p.m - | rotações por minuto |
| RAF - | proteína RAF |
| RAS - | proteína RAS |
| RBD - | domínio de ligação RAS |
| RCBP - | Registro de Câncer de Base Populacional |
| RET - | gene do receptor para fator de crescimento neurotrófico derivado de célula |

| | |
|------------------|---|
| <i>RET/PTC</i> - | rearranjos do gene <i>RET</i> com genes heterólogos |
| RFLP-PCR - | reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição. |
| SEER - | do inglês: <i>Cancer Institute Surveillance Epidemiology End Results</i> |
| T1799A - | transversão de timina para adenina no nucleotídeo 1799 do gene <i>BRAF</i> |
| T3 - | hormônio tireoideano triiodotironina |
| T4 - | hormônio tireoideano tetraiodotironina |
| TBG - | globulina ligadora de tireoglobulina |
| TG - | tireoglobulina |
| TNM - | Tumor, Nódulos (metástases linfonodais), Metástases à distância |
| TRH - | do inglês: <i>thyrotropin-releasing hormone</i> |
| TSH - | do inglês: <i>thyroid stimulating hormone</i> |
| OMS - | Organização Mundial da Saúde |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| I – INTRODUÇÃO | 14 |
| 1. Anatomia e Fisiologia | 14 |
| 2. Doenças da Tireóide | 17 |
| 2.1 Bócio e doença nodular da tireóide | 17 |
| 2.2 Tumores tireoideanos | 17 |
| 2.3 Adenoma Folicular de Tireóide (AFT) | 18 |
| 2.4 Carcinoma Papilar de Tireóide (CPT) | 18 |
| 2.5 Microcarcinoma Papilar de Tireoide (MCPT) | 20 |
| 2.6 Carcinoma Folicular de Tireóide (CFT) | 21 |
| 2.7 Carcinoma Pobremente Diferenciado de Tireóide (CPDT) | 22 |
| 2.8 Carcinoma Anaplásico de Tireóide (CAT) | 23 |
| 2.9 Carcinoma Medular de Tireóide (CMT) | 23 |
| 2.10 Historia Natural do Microcarcinoma Papilar de Tireoide | 23 |
| 2.11 Fatores de Risco do MCPT | 26 |
| 2.12 Epidemiologia do MCPT | 27 |
| 2.13 O gene <i>BRAF</i> | 28 |
| 2.14 A Proteína BRAF | 31 |
| 2.15 Implicações Clínicas da Mutação V600E de <i>BRAF</i> nos MCPT | 32 |
| II – OBJETIVOS | 34 |
| 3. Objetivo Geral | 34 |
| 3.1 Objetivos Específicos | 34 |
| III - METODOLOGIA | 35 |
| 4. Aspectos éticos da pesquisa | 35 |
| 4.1 Seleção de casos de microcarcinoma papilar de tireóide | 35 |
| 4.2 Preparo das amostras | 36 |
| 4.2.1 Extração de DNA das amostras de microcarcinomas papilíferos de tiroide | 36 |
| 4.2.2 Lise celular | 37 |
| 4.2.3 Precipitação de proteínas | 37 |
| 4.2.4 Precipitação do DNA | 37 |
| 4.2.5 Hidratação do DNA | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.6 Análise molecular da mutação <i>V600E</i> do gene <i>BRAF</i> por meio de <i>PCR</i> e <i>RFLP</i> (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) | 38 |
| 4.2.7 Análises Estatísticas | 39 |
| IV – RESULTADOS | 40 |
| 5. Características clinicopatológicas dos pacientes com MCPT..... | 40 |
| V – DISCUSSÃO..... | 44 |
| VI – CONCLUSÃO | 48 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 49 |
| ANEXO | 56 |

I - INTRODUÇÃO

1. Anatomia e Fisiologia

A tireóide é uma glândula sem ductos, situada à frente e em volta da traquéia (Figura 1). Situa-se logo abaixo da cartilagem tireóide. A glândula tireóide é constituída por dois lobos – direito e esquerdo – conectados por uma pequena parte delgada de tecido (istmo). Algumas vezes, o istmo dá origem a um terceiro lobo, medial, conhecido como lobo piramidal. Sob condições normais, a glândula pesa entre 10 e 25 gramas. Uma grande diversidade de células compõe o tecido tireoideano, incluindo células foliculares, parafoliculares ou células C, células endoteliais, fibroblastos, linfócitos e adipócitos. Células foliculares são importantes para a síntese e estoque do hormônio tireoideano, enquanto as células C são responsáveis pela produção da calcitonina, um hormônio regulador da homeostasia do cálcio (Barrett, 2010).

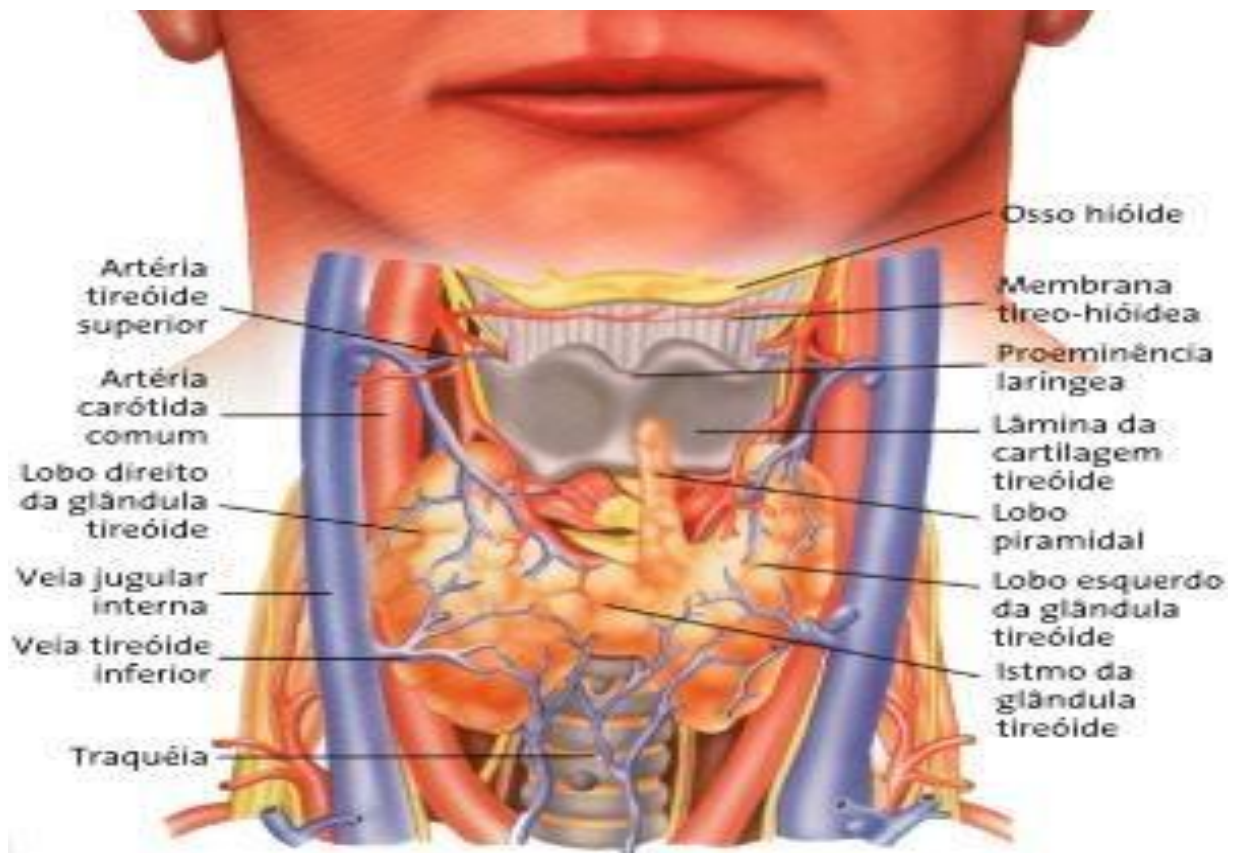


Figura 1 - Esquema ilustrativo da anatomia da tireóide.
Fonte: jorgebastosgarcia.com.br

Os hormônios tireoideanos, tri-iodotironina (T3) e tetra iodotironina ou tiroxina (T4) são produzidos pela iodação de resíduos de tirosina específicos localizados na tireoglobulina, catalizada por peroxidases (Figura 2). A glândula tireóide libera principalmente T4 na circulação. A concentração de T4 no plasma é em torno de 90 nM, enquanto que para o T3 é em torno de 2nM. A maior parte do T3 circulante é, assim, formada nos tecidos periféricos pela deiodação do T4 (um processo que ocorre principalmente no fígado) (Molina, 2006).

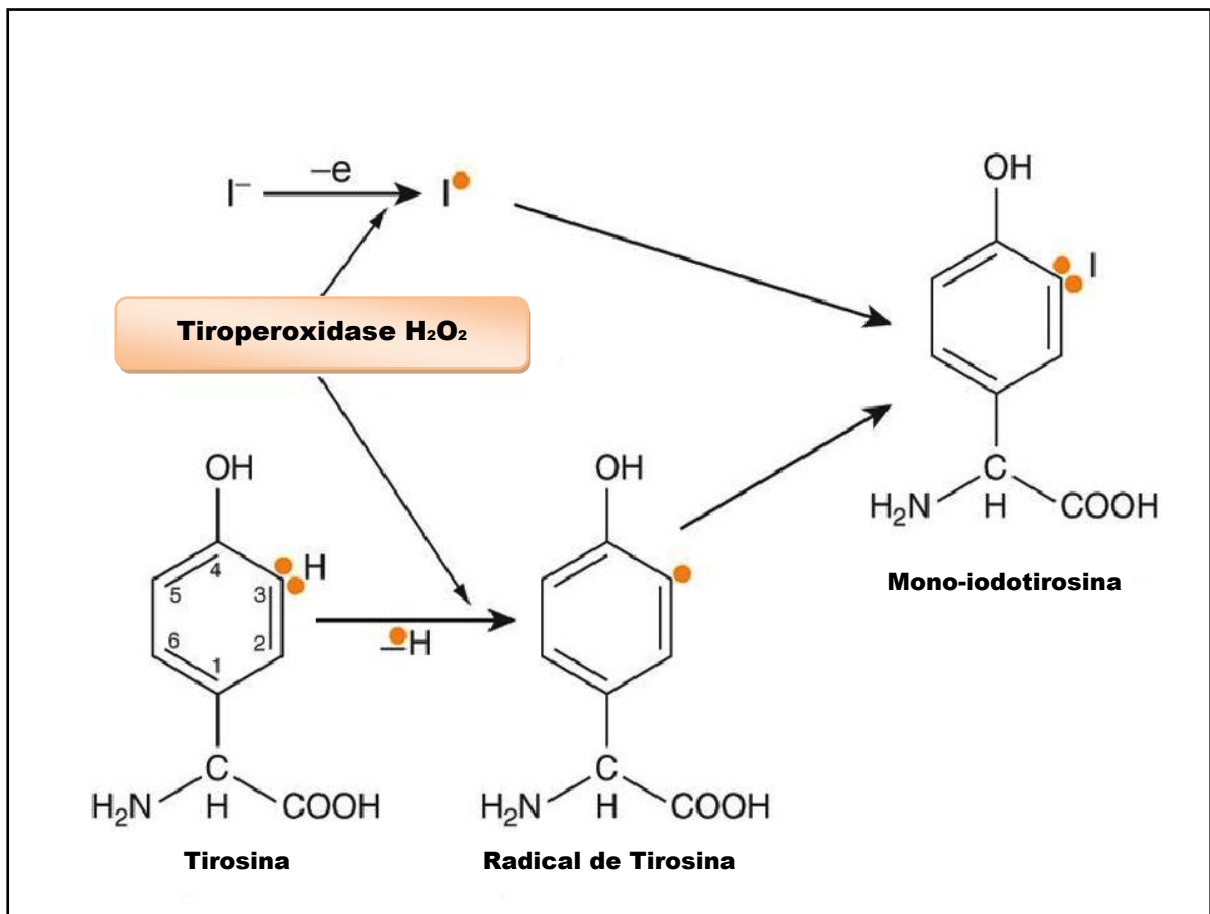


Figura 2 - Iodação da tireoglobulina. Fonte: Rang et al; 2010.

A maior parte do T3 e T4 circulante está ligada a uma globulina plasmática (*tiroxine-binding-globuline*, TBG), enquanto uma pequena fração circula livre, (0,3% do T3 e 0,03% do T4). A síntese e a liberação do hormônio tireoideano são reguladas pelo eixo hipotálamo-pituitário-tireóide (Figura 3). O hormônio liberador de tireotropina (*thyrotropin-releasing hormone*-TRH), um tripeptídeo liberado no hipotálamo, liga-se ao receptor em células da região anterior da glândula pituitária, promovendo a estimulação da exocitose e liberação do hormônio estimulador da tireóide (*thyroid stimulating hormone*-TSH) na circulação sistêmica. O TSH então se

liga ao receptor de TSH na membrana basolateral da célula folicular ativando uma cascata que leva à produção de hormônio tireoideano e à sua liberação. Um *feed-back* negativo regulatório é feito principalmente pelo T3 produzido intracelularmente no hipotálamo e na hipófise anterior pela deiodação do T4. A liberação do *TSH* pela pituitária é, assim, inibida tanto direta quanto indiretamente. Além desse mecanismo, a dopamina, somatostatina e glicocorticóides também exercem um efeito negativo na liberação de *TSH* (Molina, 2006).

Os hormônios da tireóide podem afetar múltiplos eventos celulares pela ligação a seus receptores, os quais estão presentes em praticamente todos os tecidos. Os receptores dos hormônios tireoideanos são receptores nucleares (fatores de transcrição ligantes a DNA) que respondem à ligação do hormônio por funcionarem como tomadas/interruptores moleculares (Molina, 2006).

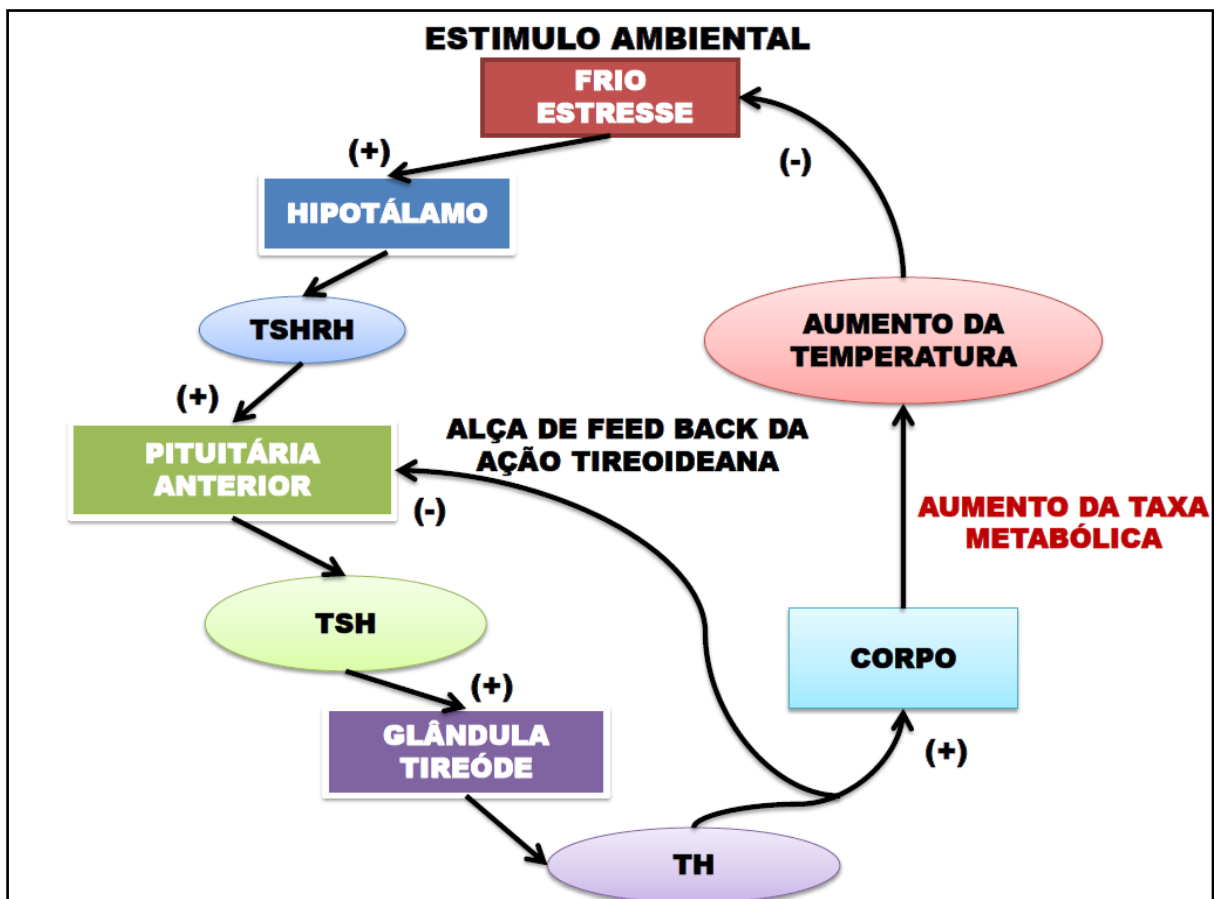


Figura 3 - Esquema de controle por feed-back do eixo talamo-hipotálamo- tireóide
 Fonte: adaptada de <http://www.scielo.br/img/revistas/ca/v18n3/a03>

2. Doenças da Tireóide

2.1 Bócio e doença nodular da tireóide

A palavra bócio refere-se a qualquer aumento do volume tireoideano, difuso ou nodular, desde que excluídas as neoplasias. Defeitos da biossíntese hormonal, deficiência de iodo, doenças autoimunes e doenças nodulares podem cada uma destas, levar ao desenvolvimento de bócio por meio de mecanismos diferentes (Burger, 2004).

A síntese defeituosa e a deficiência de iodo resultam em menor produção de hormônio tireoideano e, portanto, na elevação dos níveis de TSH. Estes últimos estimulam o crescimento tireoideano como mecanismo compensatório. A doença de Graves e a tireoidite de Hashimoto também estão associadas com bócio. Na doença de Graves, uma imunoglobulina específica para o receptor de TSH é a principal responsável pelo crescimento da glândula, enquanto na tireoidite de Hashimoto esse crescimento é devido a um defeito adquirido na síntese hormonal, em decorrência de auto-anticorpos contra a tireoglobulina ou contra a tireoperoxidase. O impedimento da síntese hormonal gera níveis elevados de TSH. Nessa última, o infiltrado de linfócitos e fatores de crescimento oriundos do sistema imune também contribuem para o aumento da glândula. Nódulos tireoideanos estão relacionados a distúrbios de crescimento das células parenquimatosas e, frequentemente, estão combinados com o desenvolvimento de fibrose (Burger, 2004). Vinte por cento das doenças tireoideanas são autoimunes e estas afetam de 2 a 5% da população, notadamente do sexo feminino (Sheu & Schmid, 2003).

2.2 Tumores tireoideanos

A Organização Mundial da Saúde (OMS), na sua última edição, classifica os tumores tireoideanos em carcinomas bem diferenciados da tireoide - carcinoma papilífero de tireóide (CPT) e carcinoma folicular de tireoide (CFT), carcinoma pobremente diferenciado de tireóide (CPDT), carcinoma indiferenciado ou anaplásico de tireóide (CAT), carcinoma medular de tireóide (CMT) e, o único tumor benigno, adenoma folicular de tireóide (AFT). Estes tumores originam-se das células

foliculares, à exceção do carcinoma medular que surge das células C (Chiacchio et al, 2008).

Os carcinomas bem-diferenciados da tireóide, i.e., o carcinoma papilar da tireóide e o carcinoma folicular da tireóide, respondem por 90% dos tumores malignos da tireóide e têm como denominador comum o fato de terem um bom prognóstico por manterem uma semelhança estrutural e funcional com o parênquima normal como, por exemplo, preservarem a expressão de tireoglobulina e da proteína *NIS* (*sodium iodine symporter*). São mais comuns nas mulheres entre a quarta e quinta décadas de vida (Byrd et al, 2012).

2.3 Adenoma Folicular de Tireóide (AFT)

Não existem dados epidemiológicos consistentes para o AFT e falta critérios para sua distinção com os nódulos hiperplásicos. Adenomas foliculares usualmente se apresentam como estruturas nodulares solitárias, circunscritas por fina cápsula. Por definição, não há invasão capsular e/ou vascular (DeLellis et al, 2004).

Adenoma oncocítico, também conhecido como adenoma oxifílico ou adenoma de células de Hurthle, é uma variante comum do adenoma folicular de tireóide, caracterizada por células cujo citoplasma é granular e intensamente eosinofílico, com núcleos largos e nucléolos proeminentes (Pisanu, 2010). Adenomas atípicos apresentam celularidade alta, núcleos atípicos e histopatologia incomum (DeLellis et al, 2004). Eventos genéticos variados têm sido encontrados nos AFT, tais como aberrações cromossômicas numéricas, como a trissomia do cromossomo 7 dentre outras (Belge et al, 1998). Rearranjo *BAX8-PPAR γ* e mutações do gene *RAS*, embora características dos carcinomas foliculares, têm sido também encontrados nos AFT (Marques et al, 2002).

2.4 Carcinoma Papilar de Tireóide (CPT)

O CPT é o câncer mais comum de tireóide, responsável por 70 a 80% dos casos e tem o melhor prognóstico de todos. Comumente se dissemina pela via linfática e tende a permanecer confinado à tireóide e nos gânglios linfáticos regionais durante anos. As principais características microscópicas desses tumores (figura 4) são as estruturas papilares (pedículos fibrovasculares recobertos por epitélio de

células foliculares), corpos psamomatosos formados por lâminas de material necrótico e calcificação, pseudo inclusões nucleares e grandes nucléolos (Hay, 1990). O carcinoma papilar apresenta variantes histológicas e a variante clássica corresponde a dois terços dos casos e é a que também apresenta o melhor prognóstico enquanto que a variante células altas aparece em 10 a 15% dos casos e tem o pior prognóstico (Baloch e Livolsi, 2008); na variante encapsulada pode haver infiltração capsular mas não a vascular; a variante células colunares, que ocorre em torno de 14% dos casos é mais frequente no sexo masculino. Outros tipos histológicos são o CPT de células claras, o CPT esclerosante difuso e o CPT variante folicular cuja frequência só é menor que a variante clássica (Albores-Saavedra & Wu, 2006). O tumor pode ser multicêntrico em 20 a 80% dos casos e bilateral em cerca de 30% dos pacientes. Há evidências que focos não contíguos do tumor surgem de novos clones com precursores independentes (Shattuck et al, 2005).

Os eventos genéticos responsáveis pelo desenvolvimento do CPT são bem caracterizados. O proto-oncogene *RET* localizado no cromossomo 10q11.2, codifica um receptor de membrana tirosina-quinase (KTR). Sob condições normais é expresso em células neurais e neuroendócrinas, como também durante a embriogênese (Nikiforov, 2002). Rearranjos cromossômicos, que ligam genes não relacionados à parte distal do gene *RET* (*RET/PTC*), resultam numa ativação ilegítima deste e, assim, de toda via oncogênica *RET-Ras-Raf-MAPK* (Knauf, 2003). Mutações do gene *Ras*, que ocorrem em um a três cânceres humanos, são pouco frequentes no CPT (Albarel et al, 2012).

A mutação V600E do gene *BRAF* é a alteração genética mais comum nos CPT com uma incidência que varia entre 28% a 83% dos casos (Xing, 2007). A proteína BRAF pertence a uma família de quinases de serina/treonina e a mutação V600E ocorre quase que exclusivamente no CPT, além de ser uma mutação excludente com os rearranjos *RET/PTC* (Xing, 2005). Esse fato sugere que a mutação V600E do gene *BRAF* seja um evento alternativo para o desenvolvimento dos CPT. Em conjunto tais características conferem à mutação V600E do gene *BRAF* um potencial tanto diagnóstico quanto prognóstico para os CPTs (Xing, 2005; Xing, 2009).

2.5 Microcarcinoma Papilar de Tireóide (MCPT)

Os Microcarcinomas Papilares de Tireóide são definidos como Carcinomas Papilares de Tireóide com uma dimensão de até um centímetro de dimensão (Figuras 4 e 5) (DeLellis et al, 2004). Essas lesões são altamente prevalentes em estudos de autópsias com prevalência incidental, embora os dados sejam muito discrepantes: nos EUA a taxa de prevalência em peças de autópsia varia de 6 a 9% (Lang et al, 1988); na Finlândia essa prevalência chega a 35% (Harach et al, 1985). No Brasil, um estudo com 166 peças de autópsias consecutivas demonstrou uma prevalência de 7,8% (De Matos et al, 2006). Uma característica interessante dos MCPT ocultos, estudados em peças de autópsia, é que não apresentam diferenças estatísticas na prevalência com relação ao sexo (De Matos et al, 2006).

O MCPT incidental também pode ser diagnosticado em 12% das peças de tireoidectomias motivadas por patologias benignas (Bradly et al. 2009). Por outro lado, os MCPT não incidentais, aqueles diagnosticados antes do tratamento cirúrgico, descobertos casualmente, seja numa autopalpação ou em exame ultrassonográfico de rotina, apresentam-se mais frequentemente nas mulheres e exibem comportamento mais agressivo (Nucera & Pontecorvi, 2012). Os MCPT não incidentais são diagnosticados em estágio mais avançado e exibem fatores prognósticos de maior agressividade tais como invasão capsular, que chega a 8,7% dos casos, e extravasamento extratireoideano, que ocorre em 35% dos casos. Metástases linfonodais são observadas em 30% dos casos enquanto metástases à distância ocorrem em 0,2% dos casos. Outros achados anatomopatológicos frequentes incluem a multifocalidade e a bilateralidade, que ocorrem em 35% e 60% dos casos respectivamente (Mercante et al, 2009). Em um estudo retrospectivo, Pisanu et al. demonstrou recidiva linfonodal em 4,1% em 149 pacientes (Pisanu et al, 2009).

Tanto o rearranjo *RET/PTC* quanto a mutação V600E do gene BRAF podem ocorrer no MCPT, mas essa última, além de ser mais frequente, é apontada como um fator de mau prognóstico, aumentando os índices de proliferação, de dediferenciação e de transformação celular (Liu D. et al, 2007).

A introdução de aparelhos de ultrassonografia de alta definição aliada à PAAF levou a um aumento dramático na incidência do câncer da tireóide, notadamente dos casos de MCPT (Nucera e Pentecovi, 2010). Na América do Norte houve uma

significativa mudança na incidência do câncer de tireóide nos últimos 30 anos e hoje, o MCPT representa a maioria dos CPTs diagnosticados em pacientes com 45 anos de idade ou mais (Hughes et al, 2011). No Hospital Araujo Jorge da Associação de Combate ao Cancer em Goias, entre os anos de 2005 a 2009 ocorreu uma virada na proporção entre os macro e os microcarcinomas de tireóide e os microcarcinomas papilares de tireóide tornaram-se os mais frequentes nos laudos das peças cirúrgicas das tireoidectomias (dados do Sertor de Anatomia Patológica do HAJ).

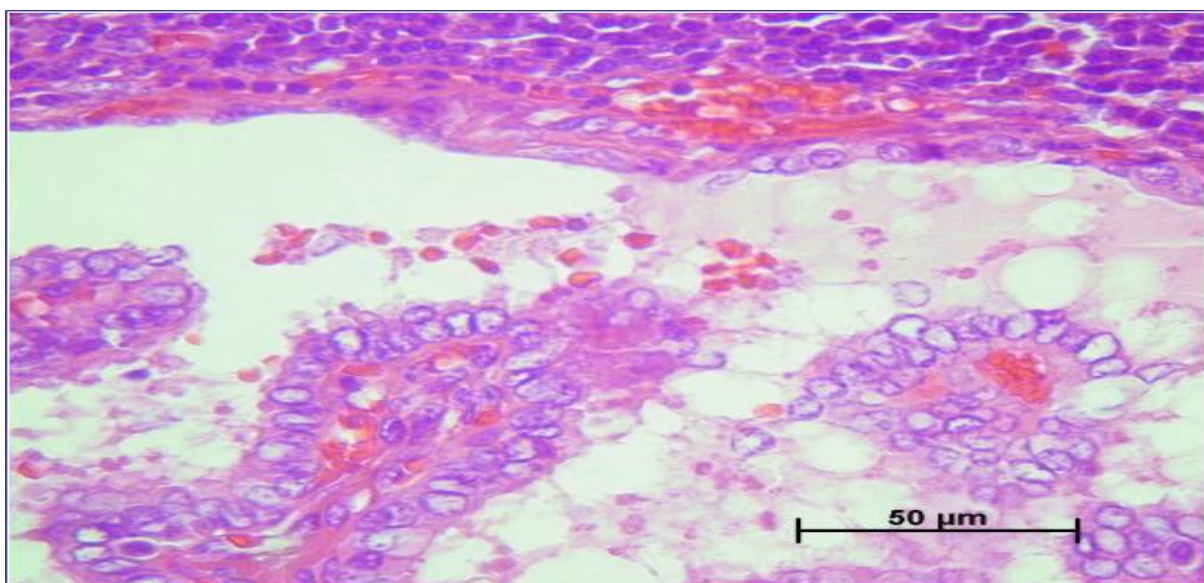


Figura 4 - Fotomicrografia mostrando um microcarcinoma papilar de tiroide.
Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica.

2.6 Carcinoma Folicular de Tireóide (CFT)

O CFT corresponde a aproximadamente 15% dos tumores malignos da tireóide. Ele ocorre geralmente em uma faixa etária maior que o CPT e metastatiza mais frequentemente por via hematogênica para pulmões, ossos e, raramente, fígado. O diagnóstico microscópico é confirmado pela invasão vascular ou invasão capsular, sendo que essa última depende do exame histopatológico da peça o que impossibilita a conclusão diagnóstica pela PAAF. O CFT, que apresenta invasão limitada de cápsula ou de vasos, é chamado de CFT minimamente invasivo (Baloch e Livolsi, 2007). O CFT, ou sua variante, carcinoma de células oxifílicas ou carcinoma de células de Hurthle, tem prognóstico pior que o CPT (Clark, 2010). Esses tumores são caracterizados predominantemente por rearranjos *PAX8-PPAR γ* ,

mutações pontuais do gene *Ras* e aneuploidia (Parameswaran et al, 2010). O gene *PAX8* (gene *8 box - pareado*) é um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento da tireóide, enquanto o gene *PPAR γ* pertence à superfamília dos receptores nucleares e é expresso em pequenas quantidades no tecido tireoideano normal (Nikiforov, 2003).

Mutações pontuais no gene *Ras* também têm sido identificadas no CFT. *Ras* são pequenas *GTPases* que detêm um papel central na transmissão de sinal oncogênico. Como eles também são encontrados em adenomas foliculares, considera-se que essa mutação seja um evento inicial na carcinogênese tireoideana (Parameswaran et al, 2010).

Uma observação interessante é que o rearranjo *PAX8-PPAR γ* e a mutação do gene *Ras* são mutuamente excludentes e, portanto, indicam que o desenvolvimento do CFT segue caminhos alternativos (Nikiforova et al, 2003).

Anomalias no cromossomo 3 são características do CFT, sendo, as mais comuns, perdas em 3p (Herrmann et al, 1991). Deleções de 1p, 6p/q, 8p/q, 9p, 11q, 13q, 18q e 22q estão entre as alterações do número de cópias mais encontradas nos pacientes com CFT (Roque et al, 2003).

2.7 Carcinoma Pobrementemente Diferenciado de Tireóide (CPDT)

Os CPDT representam de 4% a 7% dos tumores malignos de tireóide (De Lellis et al, 2004). Eles mostram poucas evidências de diferenciação folicular e têm características morfológicas e de comportamento divididas entre os carcinomas diferenciados e os indiferenciados da tireóide. Frequentemente, apresentam-se como tumores volumosos de tireóide com ou sem envolvimento linfonodal. Metástases para pulmão e ossos são relativamente frequentes à época do diagnóstico (Bongiovanni et al, 2009). Alterações no gene *TP53* variando entre 17% a 38% e no gene *Ras* entre 18% a 63%, foram relatadas no CPDT. Dependendo da presença associada de CPT ou de CFT, podem estar presentes alterações nos genes *BRAF* e *RET/PTC* ou *PAX8/PPAR γ* , respectivamente (Bongiovanni et al, 2009).

2.8 Carcinoma Anaplásico de Tireóide (CAT)

Os CAT correspondem entre 1% a 2% dos cânceres de tireóide e geralmente se apresentam como massas volumosas na região da tireóide, de crescimento rápido e muito infiltrativas, invadindo principalmente traquéia, laringe e esôfago. Metástases para linfonodos cervicais e para o pulmão são frequentes e a recorrência é a regra após tratamento cirúrgico (Clark, 2010).

As mutações nos genes *TP53*, *CTNNB1* ou *PIK3CA*, entre outras, têm sido demonstradas nesses tumores (Smallridge et al, 2009). Há controvérsias se esses tumores são resultantes de dediferenciação de tumores de tireóide. Mutações do gene *BRAF* (presentes no CPT) e no gene *RAS* (comuns no CFT) são encontradas entre 10% a 33% e entre 20% a 90%, respectivamente. É interessante a observação que os rearranjos *RET/PTC* e *BAX8/PPAR γ* não foram encontradas no CAT (Nikiforov, 2004).

2.9 Carcinoma Medular de Tireóide (CMT)

O carcinoma medular de tiroide se origina das células parafoliculares da tireóide e correspondem de 5% a 8% de todos os cânceres de tireóide. Conquanto a maioria desses tumores seja esporádica, um quarto são hereditários, principalmente pertencentes à síndrome endócrina múltipla tipo 2 (MENA e MENB) ou à forma familiar (CMTF). As mutações do gene *RET*, germinativas ou somáticas, são eventos chave para o desenvolvimento desses cânceres (Cerrato et al, 2009).

2.10 Historia Natural do Microcarcinoma Papilar de Tireoide

A doença tireoideana nodular é comum, aumenta com a idade, depende da população estudada e dos métodos usados no diagnóstico. Estima-se que nódulos palpáveis estejam presentes em 4% da população. Com a ultrassonografia de alta resolução, a prevalência de nódulos na tireóide pode chegar a 67%. Nódulos solitários têm maior chance de malignidade (Dean e Gharib, 2008), entretanto, apenas 5 -10% dos nódulos detectados são malignos (Coeli et al, 2005).

Os MCPT geralmente são diagnosticados durante exames de imagem do pescoço por outras patologias. A citologia de material obtido por meio de punção

guiada por USG tem uma alta acurácia e é dependente da qualidade do equipamento, da habilidade do radiologista que faz o exame e da experiência do citopatologista. Em uma revisão de 18,183 punções guiadas por USG, a acurácia geral foi de 95% (Dean e Gharib, 2008).

O “*National Cancer Institute*” dos Estados Unidos, em 2007, publicou o Sistema Bethesda para Laudos Citopatológicos de Tireóide. Este sistema prevê a classificação das amostras em seis classes, e para cada classe, um risco de malignidade com a respectiva recomendação de manejo clínico (Figura 6, 7 e 8) (Baloch et al, 2008).

| CATEGORIA DIAGNÓSTICA | RISCO DE MALIGNIDADE(%) | MANEJO CLÍNICO |
|---|-------------------------|---|
| (I) Amostra não diagnóstica ^a | - | Repetir a PAAF com auxílio de ultrassom |
| (II) Benigno | 0-3 | Seguimento Clínico |
| (III) Atipias de Significado Indeterminado ^b | 5-15 | Repetir PAAF |
| (IV) Suspeito de Neoplasia Folicular ^c | 15-30 | Cirurgia: Lobectomia |
| (V) Suspeito de Malignidade | 60-75 | Cirurgia: Tireoidectomia ou lobectomia |
| (VI) Maligno | 97-99 | Cirurgia: Tireoidectomia |

Figura 5 - Classificação de Bethesda para citologia de lesões de tireóide.
Fonte: adaptado de Baloch et al, 2008.

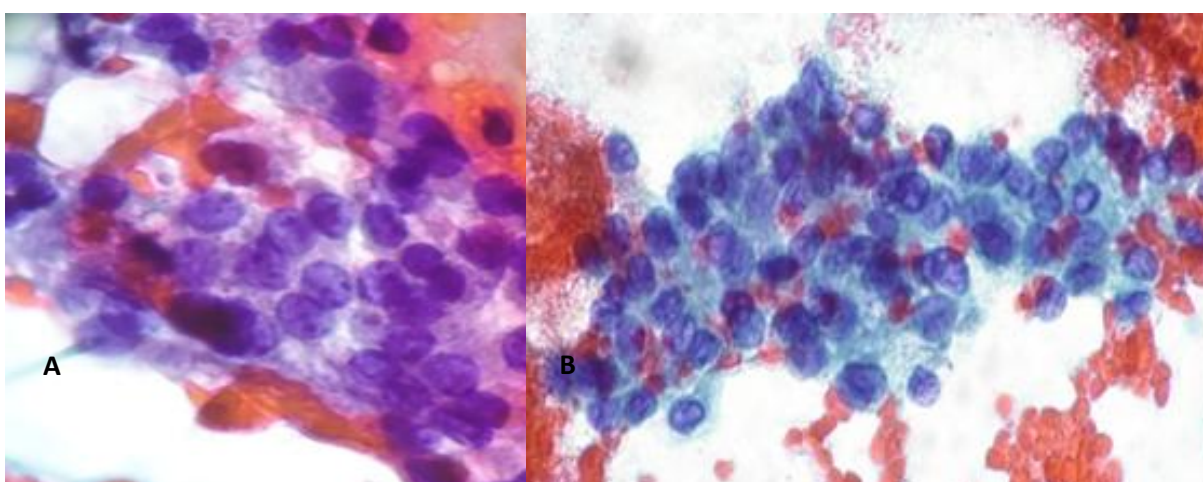


Figura 6 - Fotomicrografia apresentando aspectos citológicos de tireóide correspondentes à (A) - Categoria III (atipias de significado indeterminado) e Categoria IV (suspeito de malignidade - carcinoma papilar), de acordo com o Sistema de Bethesda.
Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica.

Nas classes citológicas III e a IV do Sistema de Bethesda, não é possível definir com certeza, com certeza, a natureza da lesão. Nesse contexto, o advento de um marcador molecular, torna-se relevante para planejar o tratamento adequado em cada caso específico (Niemeier et al, 2012; Nucera e Pontecovi, 2012).

O estudo ultrassonográfico é o principal método de imagem para o diagnóstico dos MCPT. A possibilidade de um tumor maligno aumenta quando detectado padrão sólido, hipocogênico, vascularização central predominante, bordas imprecisas da lesão, razão do diâmetro antero-posterior maior em relação ao diâmetro transverso, calcificação fina na lesão e razão altura/base de dois para um, ou maior(figura 6) (Ginat,D et al, 2010).

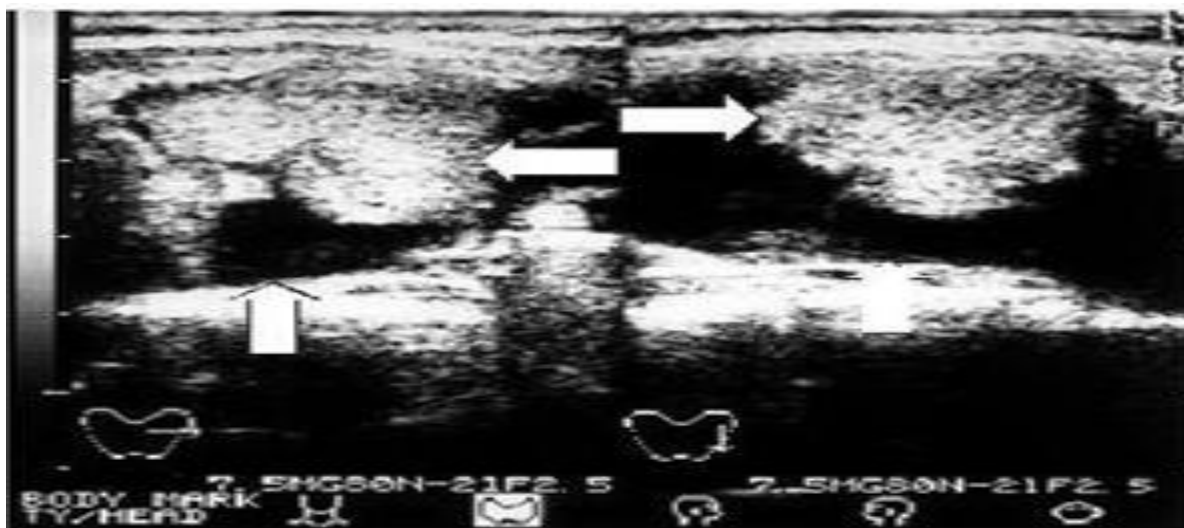


Figura 7 - Imagem ultrassonográfica de MCPT em lesão sólido-cística.
Fonte: Departamento de Radiologia do Hospital Araújo Jorge.

Recentemente, a elastografia foi adicionada ao uso da USG para detectar lesões suspeitas. O uso de scaneres tomográficos são de pouca valia nesses tumores pelo seu pequeno volume assim como também as cintilografias são de pouca valia como screening, haja vista que 85% dos nódulos frios são benignos(Cooper et al, 2009).

O tratamento do MCPT é eminentemente cirúrgico e a extensão da cirurgia depende do número de lesões, da bilateralidade da lesão e da variante histológica em questão, conquanto o patologista possa fornecer essa informação no exame de congelação. A extensão da cirurgia depende ainda de fatores como a idade do paciente, do sexo, extravasamento capsular e da presença de metástase linfonodais (Nucera e Pontecovi, 2012).

Geralmente, a cirurgia é suficiente para garantir a erradicação da doença. A radioiodoterapia adjuvante está indicada naqueles casos onde fatores de mal prognóstico estejam presentes. Não obstante, deve-se ter em mente que nem sempre é possível conhecer todos esses fatores até o laudo anatomopatológico final (Nucera e Pontecovi, 2012).

A taxa de cura para o MCPT chega a 98% (Gilliland et al, 1997) e o insucesso geralmente ocorre mediante recidiva loco-regional. A prevalência de recorrência varia amplamente na literatura, entre 0,3 a 37% e o óbito doença- específica ocorre em menos de 0,4% dos casos (Roti et al, 2008).

2.11 Fatores de Risco do MCPT

Exposição à radiação ionizante é o único fator ambiental reconhecidamente relacionado ao desenvolvimento do câncer de tireóide (Imaizumi et al.; 2006). No entanto, a maioria dos pacientes com cânceres de tireóide não relatam essa história. Outros dados têm sido investigados, tais como fatores alimentares, fatores genéticos ou fatores hormonais, mas os resultados são controversos (Dean e Gharib, 2008).

Estudos sobre a exposição aguda à radiação ionizante com armas nucleares ou acidentes nucleares confirmam essa (Imaizumi et al.; 2006). É muito característico, por exemplo, que em regiões severamente atingidas pelo acidente nuclear de Chernobyl, em 1986, a incidência do câncer de tireóide em crianças aumentou significativamente (Zablostska et al.; 2011).

A ingestão de iodo, estados inflamatórios da glândula tireóide, hormônios femininos, receptores hormonais relacionados ao sexo, fatores genéticos hereditários são citados na literatura de maneira não uniforme. Em regiões onde há deficiência da ingestão de iodo, quando há políticas públicas para corrigir essa deficiência, segue-se um aumento do número de casos de CPT, inversamente proporcional ao número de casos de CFT. Uma relação entre tireoidite de Hashimoto e CPT é descrita, mas a tireoidite é um fator protetor de agressividade da neoplasia. História familiar de câncer em parentes de primeiro grau aumenta o risco para o câncer de tireóide, assim como algumas síndromes genéticas tais como a Síndrome de Gardner, a Polipose Adenomatosa Familiar e a Síndrome de Cowden. Níveis elevados de TSH estão implicados com aumento do risco do CT e do estadiamento mais alto (Wartofsky, 2010).

O estudo histológico do MCPT não é suficientemente capaz de prever o prognóstico desses tumores. Informações adicionais são importantes para estabelecer um prognóstico. Diversos fatores têm sido incorporados em sistemas de pontuação (AJCC/UICC, CAORTC, AGES, AMES, MACIS, entre outros) com utilidade clínica na determinação de alto ou baixo risco. Porém, nenhum desses esquemas demonstra clara superioridade sobre os outros e nem predizem a recorrência, que pode chegar a 20% (Park et al, 2010). Todos falham em prever a evolução a curto prazo, a mortalidade doença-específica ou a tendência de intervalo livre de doença (Sipos e Mazzaferri, 2010). Alguns desses fatores como o sexo, a idade, e o tamanho tumoral e extensão extratireoideana, importantes para o prognóstico nos CPT, não foram significantes em uma meta-análise realizada em pacientes com MCPT (Roti et al. 2008).

Essa diversidade de esquemas prognósticos pode ser unificada com os avanços da biologia molecular, notadamente na pesquisa de marcadores tumorais que visam tanto elevar a acurácia no diagnóstico quanto apontar um fator prognóstico definitivo. Conquanto essas tecnologias emergentes sejam uma grande promessa, ainda há obstáculos na sua utilização rotineira. Isto inclui interpretações morfológicas equivocadas do tecido nodular da tireóide, padronização inadequada dos métodos e custos financeiros ainda elevados (Xing, 2007).

2.12 Epidemiologia do MCPT

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo na incidência de câncer da tireoide em todo o mundo. Nos EUA, a incidência de carcinoma de tireoide aumentou de 3,6/100.000, em 1973, para 8,7/100.000, em 2002, resultando num aumento de três vezes (Davies et al, 2010).

No Brasil, uma grande variação na incidência de câncer de tireóide também é registrada, principalmente entre as mulheres. Belém e São Paulo são as cidades que apresentaram, respectivamente, a menor (0,8/100.000) e a maior (10,9/100.000) taxa de incidência padronizada por idade para o sexo feminino (INCA, 2012).

De forma semelhante, em Goiânia, valores de incidência crescentes são registrados para o carcinoma de tireóide em ambos os sexos. Em mulheres, a incidência padronizada aumentou de 4,89/100.000 para 11,67/100.000, no período

de 1988 a 2003, enquanto que para os homens esses coeficientes variaram de 0,40/100.000 para 1,59/100.000 (Reis et al, 2008).

As taxas padronizadas de mortalidade para o CT, na população mundial foram 0,5/100.000 nas regiões mais desenvolvidas e de 0,8/100.000 nas regiões menos desenvolvidas para o sexo feminino e de 0,4/100.000 para ambas as regiões no sexo masculino. Em Goiânia essas taxas se mantiveram estáveis para ambos os sexos (Coeli et al, 2005). As análises de tendência do câncer de tireóide no período de 1988 a 2003 mostraram haver uma tendência de aumento para ambos os sexos (Curado e Martins, 2006).

2.13 O gene *BRAF*

O gene *BRAF* é conhecido com tres nomenclaturas alternativas: oncogene *BRAF*, *BRAF1* e *RAFB1*. O símbolo oficial aprovado pelo *HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* é *BRAF*, que corresponde ao homólogo humano B1 do oncogene viral do sarcoma de murino v-raf. Esse gene codifica uma proteína com três regiões conservadas de proteína *RAF* kinase, contendo uma provável região em dedo de zinco, uma região rica em serina/treonina e um domínio quinase *C-terminal* (Sithanandam et al, 1990). É composto por 17 íntrons e 18 exons abrangendo uma região de 190.284 pb (Figura 8).

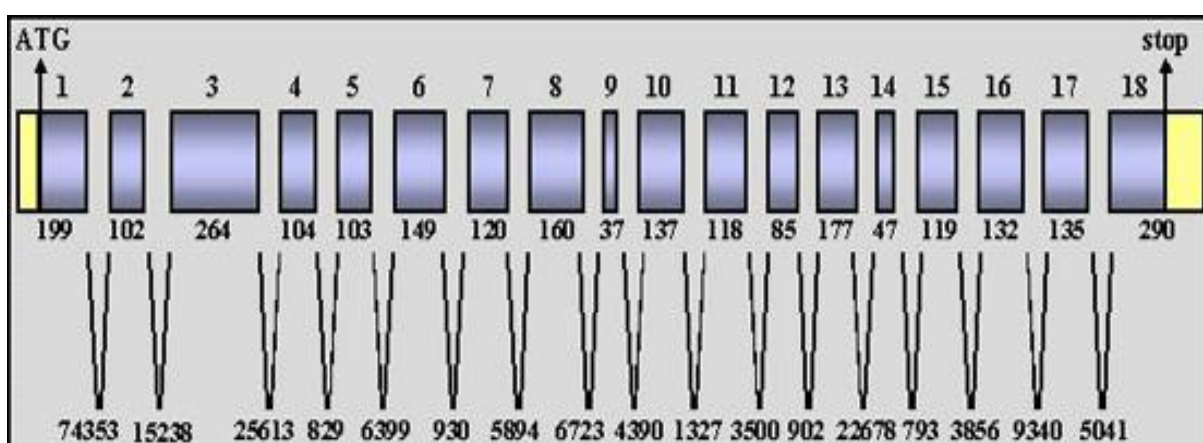


Figura 8 - Representação esquemática do gene *BRAF* com os seus 18 éxons e 17 íntrons.
Fonte: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*- site:jlhuret@AtlasGeneticsOncology.org

Dois loci humanos do gene *BRAF* foram localizados, incluindo *BRAF1* que codifica o produto funcional do gene, mapeado no braço longo do cromossomo 7q34 (Figura 9) e o *BRAF2*, um pseudogene inativo localizado em Xq13 (Eychene et al, 1992).

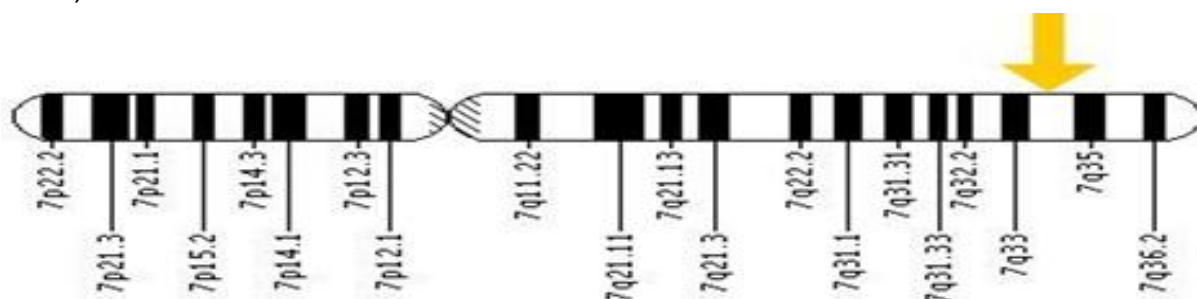


Figura 9 - Representação esquemática mostrando a localização do gene *BRAF* no cromossomo 7.
Fonte: *Genetics Home Reference-site: ghr.nlm.nih.gov*

A proteína *BRAF* tem sua atividade biológica intrinsecamente ligada à atividade da cascata *MAPK/ERK* quinase notadamente dependente da atividade de *MEK*. A superexpressão de *BRAF* está associada à diminuição da atividade de ciclina *D1* e redução do número de células estacionadas na fase *G1* (Solit et al, 2006).

Mutações somáticas no gene *BRAF* foram identificadas pela primeira vez em 66% dos casos de melanomas malignos avaliados em um ensaio clínico. Todas as mutações foram detectadas no domínio de quinase do gene e a grande maioria correspondia à simples substituição de uma valina por um ácido glutâmico na posição 600 da proteína *BRAF*, advinda da transversão de uma timina por uma adenina na posição 1799, no exon 15 do gene *BRAF*. Essa mutação missense responde por 92% das mutações do gene *BRAF* (Davies et al, 2010). A mutação *V600E* resulta numa ativação constitutiva da proteína *BRAF* e consequentemente de toda cadeia de transdução de sinais da via *MAPK* quinase (Figura 10).

A mutação V600E de *BRAF* também cursa com menor expressão do *NIS* e da peroxidase (Durante et al.;2007). Tais alterações podem alterar tanto o diagnóstico quanto a resposta terapêutica à radioiodoterapia nos PTCs. É interessante observar que o *BRAF* alterado não ocorre nem no carcinoma folicular ou medular e também está ausente nas tireoidopatias hipertróficas. Nos carcinomas anaplásicos originados de carcinomas papilares essa mutação também é detectada, mas apenas em torno de 20% dos casos (Xing et al, 2005). As mutações de *BRAF* estão restritas aos carcinomas papilares, aos carcinomas pobremente diferenciados e aos carcinomas anaplásicos derivados de carcinomas papilares (XING, 2009). Não há sobreposição entre as mutações de *BRAF*, *RET/PTC* e *RAS* (Kimura et al.; 2003), ou seja: a mutação do gene *BRAF* no câncer papilar de tireóide ocorre de maneira exclusiva e é excludente em relação a outras mutações oncogênicas.

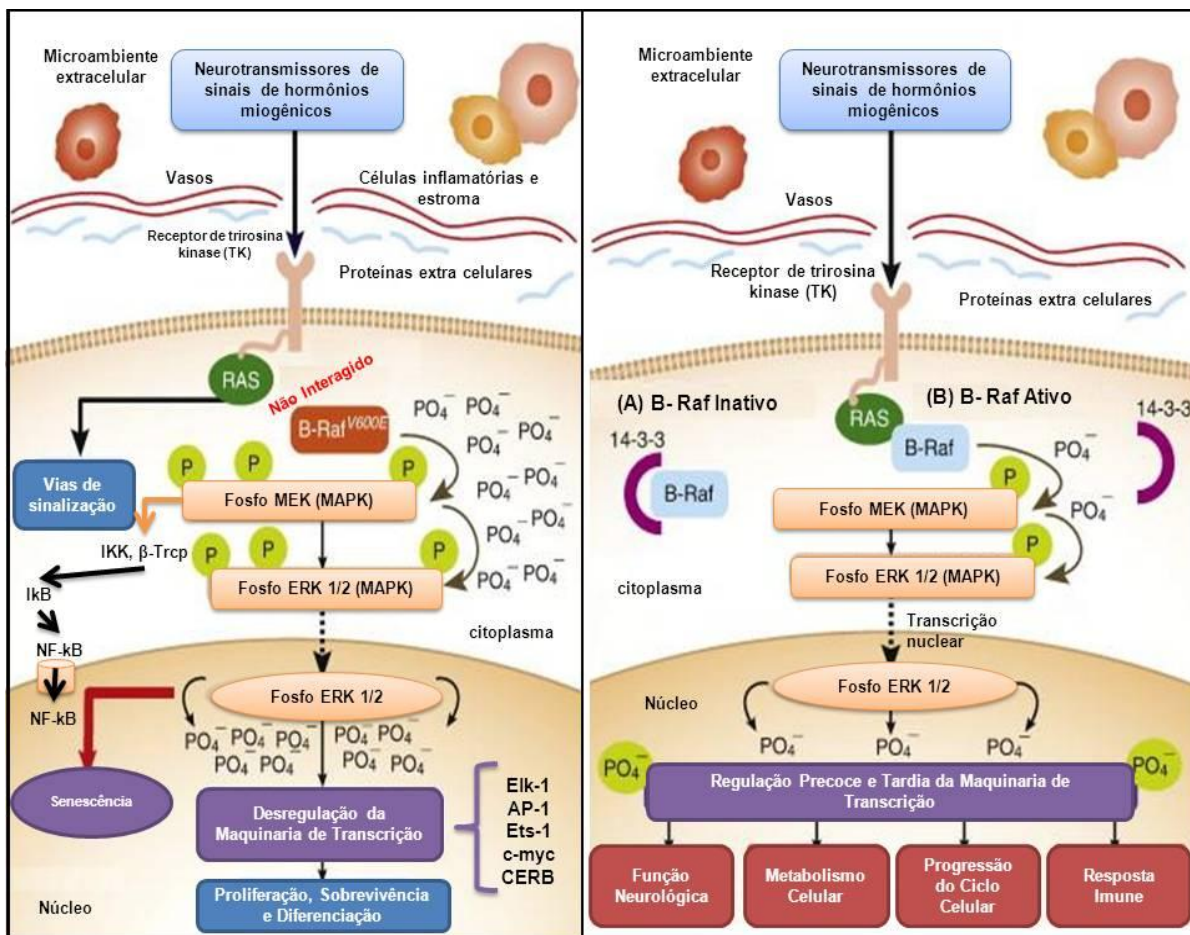


Figura 10 - Esquema da via MAPK com formas selvagens (A) e mutada (B) do *BRAF*.
Fonte: Nucera – 2012, adaptado.

2.14 A Proteína BRAF

Ao produto da expressão proteica do gene *BRAF* dá-se o nome de “proteína quinase B-raf-serina/treonina”. É uma proteína que contém 766 aminoácidos, peso molecular de 84.436 Daltons (Figura 11). Sua função está relacionada à transdução de sinais mitogênicos da membrana celular para o núcleo das células. Apresenta atividade catalítica, por meio de fosforilação de proteínas à custa do ATP e tem o zinco como cofator. Outra função é a de transferase mediada por acetilação. É encontrada em grande quantidade na membrana celular e citoplasma, onde forma complexos moleculares com outras proteínas. Esta proteína pertence à família RAF de serina/treonina-quinases, que modulam a função de outras proteínas pela transferência de grupamentos fosfato, sendo elas próprias ativadas por fosforilação (Pollock et al, 2002). Em mamíferos, existem três isoformas das RAF quinases: A-Raf, predominantemente encontrada em tecidos urogenitais; B-Raf (BRAF), altamente expressa em neurônios e testículos, em menores níveis nas células hematopoiéticas e na tireóide, é a forma mais predominante nas células foliculares e C-Raf (RAF1), que é expressa de modo ubíquo (Kolch et al, 2002).

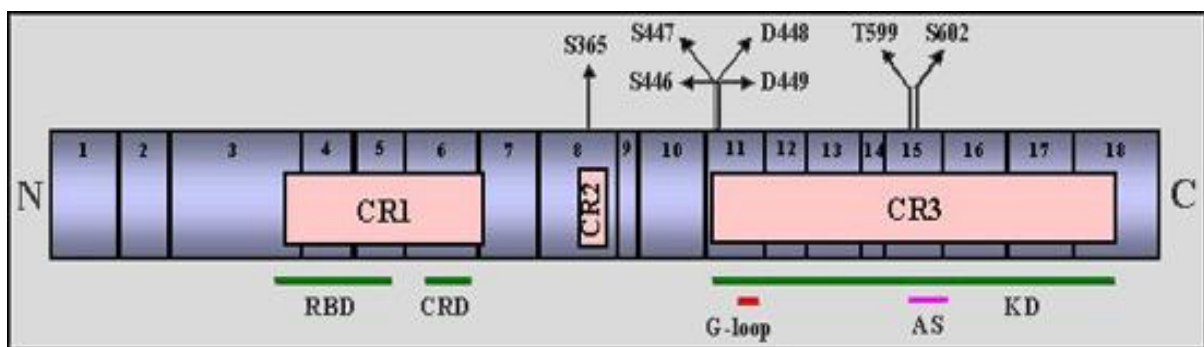


Figura 11 - Proteína BRAF. Os números dentro das caixas azuis indicam o exon a partir do qual é traduzida cada parte da proteína. As três caixas rosa representam as regiões conservadas da proteína (CR1, CR2 e CR3). As barras verdes representam três domínios distintos: RBD (domínio de ligação RAS), CRD (domínio rico em Cisteína) e KD (domínio de quinase). Uma glicina conservada (G-loop) no exon 11 é indicada com uma barra vermelha e o segmento de ativação (AS) no exon 15, com uma barra rosa. As setas pretas indicam os sítios de fosforilação das proteínas principais. C: carboxi-terminal; N: Amino-terminal.

Fonte: (*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*- site:jlhuret@AtlasGeneticsOncology.org)

Defeitos na proteína BRAF são encontrados em vários cânceres: colorretal. Pulmões, linfomas não Hodgkin, melanoma, carcinoma papilar de tireóide. Também é responsável por diversas síndromes: cardiofasciocutânea (CFC), Noonan tipo 7 e

a Síndrome de LEOPARD tipo3. No astrocitoma pilocítico, há uma aberração cromossômica que leva a uma ativação constitucional do gene *BRAF* e, conseqüentemente, à superexpressão do seu produto proteico.

Variantes naturais no códon 600, gerados pela substituição da valina (V) por ácido glutâmico (E), podem ocorrer em sarcomas, adenocarcinomas colo-retais, melanomas, carcinomas serosos ovarianos e astrocitoma pilocítico. Outras variações naturais são encontradas no câncer coloretal (K601E) e síndrome CFC (K601Q) (D638E) (Q709R) (NCBI).

2.15 Implicações Clínicas da Mutação V600E de *BRAF* nos MCPT

Muitos estudos têm demonstrado uma associação significativa entre a mutação V600E do gene *BRAF* e os carcinomas papilares de tireoide com características clínico-patológicas de alto risco. Como o câncer de tireoide apresenta incidências crescentes no mundo e esse crescimento é em grande parte devido aos MCPT, muitos trabalhos foram desenvolvidos acerca do papel dessa mutação nos MCTPs (Xing, 2009).

A revisão bibliográfica realizada neste estudo (tabela1) apresenta 13 trabalhos, envolvendo 1.837 pacientes com MCPT, com frequências de mutação V600E do gene *BRAF* presente entre 30% a 80% dos casos. As possíveis causas dessa grande variação dos resultados podem estar relacionadas a diferentes metodologias usadas na detecção da mutação, como sequenciamento direto, PCR e RFLP. Diferenças genéticas na população também explicam essas discrepâncias, vez que taxas extremamente altas são encontradas nos trabalhos sul coreanos. Diferenças populacionais também podem ser associadas aos hábitos alimentares, como maior ingestão de iodo pelos sul coreanos (Jung, 2012).

A maioria dos trabalhos da referida revisão bibliográfica demonstra associações significativas com fatores clínicos e patológicos de mau prognóstico: extravasamento capsular, doença multifocal, bilateralidade, metástase linfonodal regional, enquanto alguns não demonstram tais associações (Kim, 2005).

Um grande estudo analisou 1.150 pacientes com PTC e detectou a mutação V600E do gene *BRAF* em 67,2% dos CPT maiores que um centímetro, enquanto que essa mutação também foi alta nos pacientes com MCTP (65,6%). Outras características clinicopatológicas também foram semelhantes nos CPT e MCPT, incluindo extravasamento extra tireoideano (72,4% x 52,2%) e metástases linfonodais (51,8% x 34,9%) (Park et al., 2010).

Tabela 1 - Revisão dos artigos científicos sobre a prevalência da mutação V600E do gene *BRAF* em microcarcinomas papilares de tireóide e possíveis associações com fatores clinicopatológicos.

| Autores/ país | Metodologia | Casuística número de pacientes | Frequência da mutação V600 do gene <i>BRAF</i> | Comentários |
|--|--|---|---|--|
| Kim et al, 2005; Korea | Amostras parafinadas, microdissecção, PCR e Sequenciamento de DNA | 60 | 52% | Associação marginal com metástase linfonodal ($p = 0,06$); Tendência com extravasamento, doença multifocal e linfonodal. Mutação em quatro pacientes com LN laterais (+). |
| Park et al, 2010; Korea | Amostras parafinadas; PCR e RFLP <i>c/TspRI</i> | 278 | 67,4% | Não avaliou associações com aspectos clinicopatológicos. A frequência da mutação de <i>BRAF</i> não foi diferente entre CPT e MCPT. |
| Niemeier et al, 2012; USA | Amostras parafinadas; Sequenciamento gênico. | 59 | 77% | Localização superficial, extensão extra-tiroidiana, multifocalidade e fibrose tumoral foram associadas com a agressividade do tumor. |
| Trovisco- Soares et al, 2005; Portugal | Amostras parafinadas, PCR e SSCP. | 20 | 30% | Nenhuma associação significativa com aspectos clinicopatológicos. Multifocalidade maior nos <i>BRAF</i> selvagem. |
| Marquetti et al, 2011; Italia | Amostras de PAAF; PCR; Sequenciamento gênico. | 85 | 74% | Sensibilidade 74%; Especificidade 100%; Precisão 100%; Acurácia 77%; Aumentou a acurácia de 45% p/ 82%; Diminiu 76% dos diag de citologia suspeitos. |
| Oler et al, 2009; Brasil | Amostras parafinadas; Sequenciamento de cDNA. | 32 | 38% | Não demonstrou associações com características clinicopatológicas; Mutação associada à menor expressão de NIS. |
| kim et al, 2005; Seul | Amostras parafina- das; Sequenciamento de cDNA. | 60 | 53% | Não demonstrou associações com características clinicopatológicas. |
| Lin et al, 2008; EUA | Amostras parafinadas; PCR em tempo real | 18 | 66,7% | Associação entre a mutação e metástases linfonodais. |
| Lee et al, 2008; China | 40 amostras parafina- das e 24 colhidas a fresco; PCR; RFLP e sequenciamento gênico. | 64 | 37,5% | Associação com estadiamento mais alto; extensão extratiroidiana e metástases linfonodais. |
| Kwak et al, 2009; Seul | Amostras de PAAF; PCR; Sequenciamento gênico | 339 | 62,8% | Associação com tamanho do tumor e extensão extratiroidiana. |
| Jung et al, 2010; Seul | Amostras parafinadas; DHPLC; Sequenciamento gênico. | 721 | 80,6% | Associação negativa com variantes foliculares. |
| Lin et al, 2010; China | Amostras de PAAF; PCR; Sequenciamen- to gênico | 61 | 34% | Associação com metástase linfonodal, multifocalidade; extensão extratireoidiana e TNM alto. |
| Sediarou et al, 2004; | Amostras parafinadas; PCR; RFLP | 46 | 28.8% | Não detectou diferença entre russos e japoneses |

II - OBJETIVOS

3. Objetivo Geral

Avaliar o potencial papel prognóstico da mutação V600E do gene *BRAF* em 80 casos de microcarcinomas papilares de tireóide tratados em uma unidade de referência em câncer no Centro-Oeste brasileiro.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência da mutação V600E do gene *BRAF* nos microcarcinomas papilares de tireóide.
- Avaliar as possíveis associações entre a mutação V600E do gene *BRAF* e os aspectos clinicopatológicos dos microcarcinomas papilares de tireóide.
- Avaliar o potencial papel prognóstico da mutação V600E do gene *BRAF* nos microcarcinomas papilares de tireóide.
- Propor medidas que possam aperfeiçoar as condutas terapêuticas usadas no carcinoma papilar de tireóide.

III - METODOLOGIA

4. Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi avaliado e recomendado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge, conforme Parecer no. 059/2009 de 07 de dezembro 2009 (Anexo 1). Somente após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, em 7 de dezembro de 2009, foram iniciadas as análises. Tratou-se de um estudo retrospectivo com utilização de dados clínicos obtidos de prontuários e análise de espécimes tumorais fixados em formol e incluídos em parafina. Assim, o estudo não ofereceu nenhum risco evidente aos pacientes incluídos na análise.

4.1 Seleção de casos de microcarcinoma papilar de tireóide

Duzentos e quarenta e oito casos de MCPT foram inicialmente selecionados a partir dos livros de registro do Setor de Anatomia Patológica (SAP) do HAJ, no período de 1998 a 2006. Destes, 36 (14,5%) apresentavam metástases linfonodais. Oito casos foram excluídos por falta de informações no prontuário ou escassez de tecido tumoral. Foram selecionados então 28 casos de MCPT metastáticos. Dentre os MCPT não-metastáticos, 52 casos foram pareados com relação ao sexo e idade, totalizando um grupo com 80 pacientes. Os blocos contendo os fragmentos de tumores foram levantados a partir dos arquivos do SAP, montados em lâminas de vidro e corados pela hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica e comprovação do diagnóstico histopatológico. A revisão histopatológica foi feita por dois patologistas colaboradores deste estudo, Dra. Rita de Cássia Alencar e Dr. Élbio Cândido de Paula, ambos do SAP do HAJ, de acordo com a classificação de doenças malignas da tireóide da Organização Mundial de Saúde (DeLellis et al, 2004). Os pacientes incluídos no estudo apresentavam diagnóstico histopatológico comprovado de microcarcinoma papilífero de tireóide, blocos de parafina disponíveis no SAP do HAJ e dados clínicos e histopatológicos, incluindo: idade, gênero, tamanho do tumor, comprometimento metastático de linfonodos regionais, metástase à distância e extensão extra-tireoidiana. Os dados clinicopatológicos

foram colhidos a partir dos respectivos prontuários e utilizados para a confecção de um banco de dados.

4.2 Preparo das amostras

Os fragmentos de tumores finamente cortados, medindo de 0,5-2,0 μ , foram transferidos para microtubos, nos quais eram adicionados 500 μ l de xileno. Os microtubos foram incubados por 15 minutos à 55°C em banho-maria e, posteriormente, centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos, formando um pellet de tecido. Em seguida, o sobrenadante contendo o xileno foi descartado e a etapa anterior repetida por mais duas vezes, a fim de completar a remoção da parafina. Após a remoção da parafina, 500 μ l de etanol 100% foram adicionados aos microtubos, que foram então incubados por 15 minutos a 55°C em banho-maria e posteriormente, centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos, formando um pellet. Em seguida, o sobrenadante contendo o etanol foi descartado e a etapa anterior repetida por mais duas vezes, a fim de completar a remoção do xileno. Essas etapas foram repetidas mais duas vezes para completa remoção do xileno.

4.2.1 Extração de DNA das amostras de microcarcinomas papilíferos de tireóide

A mutação V600E do gene *BRAF* foi analisada de acordo com o procedimento proposto por Cohen et al, 2003. Utilizou-se primers específicos para o exon 15 do gene *BRAF* e amplificação gênica, produzindo fragmentos amplificados com 224 pares de bases (pb). Tais fragmentos foram submetidos à digestão com utilização da endonuclease de restrição *TspRI* que reconhece a mutação *T1799A* no gene *BRAF*. A enzima de restrição *TspRI* digere o produto de *PCR* produzindo três bandas principais: uma com 125 pb, uma com 87pb e outra com 12pb, a partir do alelo do tipo selvagem. A mutação *T1799A* abole um sítio de restrição, resultando em uma banda de 212 pb a partir do alelo mutante e bandas residuais a partir do alelo selvagem. A extração de DNA das amostras de CPT foi feita com a utilização do kit comercial *Wizard DNA Isolation Kit* (Promega), utilizando o protocolo padronizado no Laboratório de Diversidade Genética da PUC-Goiás, conforme descrição a seguir.

4.2.2 Lise celular

Cerca de 200 µl de solução de lise celular foram adicionados a cada microtubo e o fragmento de tecido macerado com uma ponteira. A fim de garantir a lise do tecido, 10 µl de proteinase K (20 mg/ml, Invitrogen) foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram homogeneizados 25 vezes por inversão e incubados a 55°C (overnight), com inversões periódicas. A completa lise celular foi concluída quando nenhum fragmento de tecido foi observado em cada um dos tubos.

4.2.3 Precipitação de proteínas

Após a lise celular, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionados 50 µl de solução de precipitação de proteínas e a solução homogeneizada com pipetagens sucessivas. Os microtubos foram então incubados a - 20°C, e, em seguida, centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos. As proteínas precipitadas formavam um pellet no fundo do tubo e o sobrenadante contendo o DNA transferido para outro microtubo limpo. Caso o pellet não fosse visível, o tubo era agitado novamente no vórtex em alta velocidade por 20 segundos e colocado novamente no freezer seguindo os passos citados anteriormente.

4.2.4 Precipitação do DNA

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo previamente identificado e acrescido de 200 µl de isopropanol 100% gelado. Os tubos foram homogeneizados 50 vezes por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos. Após a precipitação, os sobrenadantes foram descartados e os tubos invertidos sobre papel absorvente. Os pellets contendo DNA foram lavados com 200 µl de etanol 70%, homogeneizados 25 vezes por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os tubos invertidos sobre papel absorvente. Os pellets correspondentes a cada amostra foram então secos à temperatura ambiente.

4.2.5 Hidratação do DNA

Os pellets correspondentes a cada amostra foram ressuspensos em 30 µl de água milli Q autoclavada. O DNA resultante de cada amostra foi armazenado em freezer -20°C até a realização dos ensaios de *PCR*.

4.2.6 Análise molecular da mutação *V600E* do gene *BRAF* por meio de *PCR* e *RFLP* (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)

Oligonucleotídeos iniciadores específicos para o exon 15 do gene *BRAF* (Tabela 2) foram usados nos ensaios de amplificação gênica, produzindo amplicons com 224 pares de bases (pb). Todos os reagentes da *PCR* foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. As reações de *PCR* foram realizadas num volume final de 25 µl, utilizando um termociclador Veriti (Applied Biosystems), em mistura contendo 15 µl de água milli-Q; 2,5 µl de tampão (10x); 1,0 µl MgCl₂; 1,0 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 µl de dNTPs (desoxinucleotídeo-trifosfato-dATP, dCTP, dGTP, e dTTP); 0,5 µl de cada primer de *BRAF*; e 2,0 µl de DNA.

Após a amplificação por *PCR*, um amplicon de 224 pb era visualizado em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata. Todos os casos que tiveram a amplificação do fragmento do gene *BRAF* (224 pb) eram submetidos à digestão com a enzima de restrição *TspR1* (10 U/ µl New England Biolabs, Beverly, MA). A digestão foi feita num volume de 15 µl, com 10 µl do produto de *PCR*, 2,5 unidades da enzima *TspR1*; 3,5 µl de água milli-Q autoclavada; 1,0 µl de NE buffer e 0,25 µl de BSA. A digestão foi feita durante 120 minutos, a 65°C e o resultado visualizado em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata. Amostras de melanoma, contendo a mutação *T1796A* foram usadas como controle positivo.

Tabela 2 - Descrição dos primers e protocolos de ciclagem usados no ensaio de *PCR* para amplificação do gene *BRAF* em amostras de carcinoma papilífero da tireóide

| Fragmento amplificado/ Primers | Condições de ciclagem |
|--------------------------------|---|
| (=224 pb) | |
| Primer P1 (f) | |
| 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGG-3' | |
| Primer P2 (f) | |
| 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3' | |
| | 94°C - 3min 94°C - 30seg 60°C - 1min 72°C - 1min 72°C - 10min 4°C - infinito |
| | } 40 |

4.2.7 Análises Estatísticas

Um banco de dados clínicos e histopatológicos dos pacientes com carcinomas papilíferos de tireóide foi elaborado, utilizando o Software Microsoft Excel® (Microsoft Corp, EUA). Análise estatística descritiva desses dados foi realizada e tabelas de contingência foram preparadas. Os aplicativos estatísticos Prism 5 e InStat 4 foram usados para as análises comparativas das variáveis qualitativas. O teste do Chi-quadrado com correção de Yates, nível de significância de 5% foi usado para as análises comparativas e o teste exato de Fisher, quando apropriado.

IV - RESULTADOS

5. Características clinicopatológicas dos pacientes com MCPT

Os oitenta casos analisados neste estudo foram operados no Hospital Araujo Jorge (HAJ) da Associação de Combate de Câncer em Goiás, por seis cirurgiões do Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ. Apenas sete pacientes foram tratados com tireoidectomia parcial. Quarenta e um casos tiveram a tireoidectomia totalizada depois de incidentalmente ter sido encontrado MCPT em casos diagnosticados previamente com doença benigna.

Os dados clinicopatológicos dos pacientes incluídos neste estudo encontram-se descritos na tabela 3. Os MCPT tiveram ampla prevalência no sexo feminino (91,25%) e foram mais comuns na quarta década de vida. Com relação ao tamanho, os tumores menores que 5mm foram os mais frequentes (42,5%). A multifocalidade ocorreu em 51 pacientes (63,75%) e o extravasamento glandular foi observado em 19 casos (23,75%). Vinte e oito (35%) pacientes apresentaram metástase linfonodal regional, enquanto apenas dois casos (2,5%) tinham invasão vascular. Atipia celular intensa foi vista em 11 casos (13,75%). Apenas um tumor de células altas e dois de células colunares foram identificados nesse grupo. O restante eram subtipos usuais e foliculares. Tireoidite de Hashimoto foi detectada em 15 pacientes (18,75%). Recidiva loco-regional ocorreu em 14 pacientes (17,5%), num período de seguimento de cinco anos, e tais pacientes foram tratados com esvaziamento cervical linfonodal radical e radioiodoterapia adjuvante (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise descritiva dos pacientes com microcarcinoma papilífero de tiróide.

| Parâmetro | n | (%) |
|---|----------|------------|
| Sexo | | |
| Feminino | 73 | 91,25 |
| Masculino | 7 | 8,75 |
| Idade | | |
| < 45 anos | | |
| ≥ 45 anos | 47 | 58,75 |
| Media = 42,9 | | |
| Mediana = 42 | 33 | 41,25 |
| Desvio padrão = ±12,1 | | |
| Tamanho | | |
| ≤ 5,0 mm | 34 | 42,50 |
| >5,0 – 8,0 mm | 31 | 38,75 |
| 8,0 – 10,0 mm | 15 | 18,75 |
| Metástase Linfonodal | | |
| Sim | 28 | 35,00 |
| Não | 52 | 65,00 |
| Multifocalidade | | |
| Sim | 51 | 63,75 |
| Não | 29 | 36,25 |
| Ivasão Tecido Adjacente (Extensão extratiroidiana) | | |
| Sim | 19 | 23,75 |
| Não | 61 | 76,25 |
| Invasão Vascular | | |
| Sim | 2 | 2,50 |
| Não | 78 | 97,50 |
| Atipia Nuclear | | |
| Leve | 26 | 32,50 |
| Moderada | 43 | 53,75 |
| Intensa | 11 | 13,75 |
| Subtipo Tumoral | | |
| Usual | 23 | 28,75 |
| Cel. Altas | 1 | 1,25 |
| Colunar | 2 | 2,50 |
| Esclerose Difusa | 1 | 1,25 |
| Insular | 1 | 1,25 |
| Folicular | 52 | 65,00 |
| Tireoidite | | |
| Sim | 15 | 18,75 |
| Não | 65 | 81,25 |
| Recidiva | | |
| Sim | 14 | 17,50 |
| Não | 66 | 82,50 |

5.1 Associações investigadas entre a frequência da mutação V600E do gene *BRAF* e os aspectos clinicopatológicos dos microcarcinomas papilíferos de tireóide.

A mutação T1799A do gene *BRAF* resulta na substituição V600E na proteína *BRAF* e foi avaliada por meio de PCR e RFLP. A frequência da mutação V600E do gene *BRAF* nos MCPT analisados neste estudo foi de 62,5% (50/80) (Figura 12). Os dados apresentados na tabela 4 demonstram que nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre a mutação V600E do gene *BRAF* e as características clinicopatológicas dos MCPT, como sexo, idade, tamanho, metástase linfonodal, multifocalidade, extensão extratireoideana, invasão vascular, atipia nuclear, subtipo tumoral e recidiva em 5 anos ($p > 0,05$). Pacientes com tireoidite de Hashimoto tiveram uma tendência a apresentar menor frequência de mutação (12% vs 88%, $p = 0,046$). Dentre os 28 casos metastáticos, 18 (64,2%) apresentaram a mutação V600E do gene *BRAF*, entretanto, nos tumores não metastáticos a frequência da mutação foi 61,5%, igualmente elevada, configurando ausência de associação significativa entre esses parâmetros.

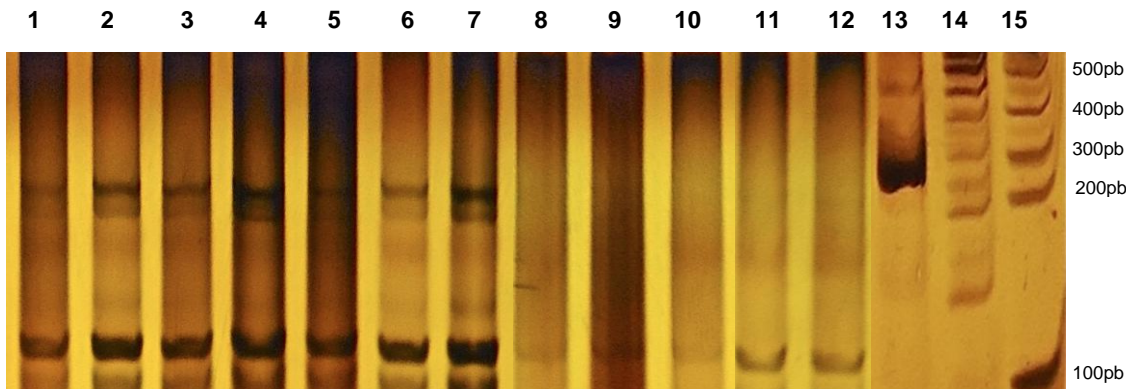


Figura 12 - Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata, mostrando produtos de restrição de um fragmento do gene *BRAF* com 224 pares de bases, contendo ou não a mutação T1799A, cortado com a enzima *TspRI*.

A presença da mutação T1799A resulta na formação de quatro fragmentos com 212-pb, 125-pb, 87-pb e 12-pb (canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), enquanto que o alelo selvagem resulta na formação de três fragmentos contendo 125-pb, 87-pb e 12-pb (canaletas 8, 9, 10, 11 e 12). A canaleta 10 apresenta uma amostra de DNA obtido de melanoma contendo a mutação T1799A. A canaleta 13 apresenta o fragmento de 224-pb não-digerido. As canaletas 14 e 15 apresentam bandas correspondentes ao padrão de peso molecular de DNA com 50-pb e 100-pb, respectivamente.

Tabela 4 - Análise univariada das possíveis associações entre a mutação V600E do gene *BRAF* e os aspectos clinicopatológicos dos MCPT

| Parâmetro | V600E(+) | V600E(-) | p |
|--|----------|---------------|-------|
| Sexo | | | |
| Feminino (n=73) | 47 (94%) | N= 26 (86,7%) | 0.416 |
| Masculino (n=7) | 3 (6%) | N= 4 (13,3%) | |
| Idade | | | |
| < 45 anos (n=47) | 29 (58%) | N= 18 (60%) | 1.00 |
| ≥ 45 anos (n=33) | 21 (42%) | N= 12 (40%) | |
| Tamanho | | | |
| ≤ 50 mm (n=34) | 20 (40%) | N= 14 (46,7%) | 0.299 |
| >50 - 80 mm (n=31) | 18 (36%) | N= 13 (43,3%) | |
| 80 – 100 mm (n=15) | 12 (24%) | N= 3 (10%) | |
| Metástase Linfonodal | | | |
| Sim (n=28) | 18 (36%) | N= 10 (33,3%) | 1.00 |
| Não (n=52) | 32 (64%) | N= 20 (66,7%) | |
| Multifocalidade | | | |
| Sim (n=51) | 29 (58%) | N= 22 (73,3%) | 0.231 |
| Não (n=29) | 21 (42%) | N= 8 (26,7%) | |
| Invasão Tecido Adjacente (Extensão extatiroidiana) | | | |
| Sim (n=19) | 36 (72%) | N= 25 (83,3%) | 0.290 |
| Não (n=61) | | | |
| Invasão Vascular | | | |
| Sim (n=2) | 1 (2%) | N= 1 (3,3%) | 1.000 |
| Não (n=78) | 49 (98%) | N= 29 (96,7%) | |
| Atipia Nuclear | | | |
| Leve (n=26) | 13 (26%) | N= 13 (43,3%) | 0.164 |
| Moderada (n=43) | 28 (56%) | N= 15 (50%) | |
| Intensa (n=11) | 9 (18%) | N= 2 (6,7%) | |
| Subtipo Tumoral | | | |
| Usual (n=23) | 12 (24%) | N= 11 (36,7%) | 0.540 |
| Cel. Atlas (n=1) | 1 (2%) | N= 0 (0%) | |
| Colunar (n=2) | 2 (4%) | N= 0 (0%) | |
| Esclerose Difusa (n=1) | 1 (2%) | N= 0 (0%) | |
| Insular (n=1) | 1 (2%) | N= 0 (0%) | |
| Folicular (n=52) | 33 (66%) | N= 19 (63,3%) | |
| Tireodite | | | |
| Sim (n=15) | 6 (12%) | N= 9 (30%) | 0.046 |
| Não (n=66) | 44 (88%) | N= 21 (70%) | |
| Recidiva | | | |
| Sim (n=14) | 8 (16%) | N= 6 (20%) | 0.763 |
| Não (n=66) | 42 (84%) | N= 42 (84%) | |

V - DISCUSSÃO

Variações na incidência de carcinomas de tireoide são registradas em diferentes regiões geográficas, refletindo possíveis características genéticas e fatores ambientais que contribuem para o seu desenvolvimento (Wartofsky, 2010). Nos últimos anos, o câncer de tireoide apresenta incidência crescente em todo o mundo, e, hoje, aproximadamente, 50% desses cânceres são microcarcinomas papilíferos (MCPT), ou seja, tumores que apresentam diâmetro menor ou igual a um centímetro (Xing, 2009; Leenhardt et al, 2004). Na Korea, a proporção dos MCPT em relação aos PTCs chega a 70% (Jung et al, 2012). No Brasil, não foram encontrados estudos acerca da proporção de microcarcinomas papilíferos de tireoide em relação aos demais tumores que acometem esta glândula. Entretanto, durante o desenvolvimento do presente trabalho, realizado em uma instituição de referência que abrange uma grande área representativa do centro-oeste brasileiro, foram observadas proporções crescentes de microcarcinomas papilíferos de tiroide (dados do Setor de Anatomia Patológica do HAJ – em preparação).

De forma geral, os carcinomas bem diferenciados de tireoide apresentam excelente prognóstico, com taxas de sobrevida entre 97% a 99% (Davies, et al 2010). Entretanto, uma fração desses tumores evolui com metástases linfonodais cervicais e recidivas. Até o momento, muitos esquemas de estratificação de risco são utilizados, mas todos têm falhas em predizer o grupo de alto risco, principalmente devido ao fato de que muitos dos fatores prognósticos delineados nesses esquemas só estarem disponíveis após a obtenção da peça cirúrgica (Melck et al., 2012; Nucera & Pontecorvi, 2012). A procura por um marcador molecular acessível que possa ser utilizado em material de punção aspirativa tem sido alvo de pesquisadores a fim de aumentar a acurácia da punção, notadamente naquelas indeterminadas, e que também tragam valor prognóstico, de modo que o tratamento possa ser feito na medida da agressividade da lesão (baixo e alto risco) (Marquetti et al, 2012; Xing et al, 2004).

A mutação do gene *BRAF* é considerada uma etapa fundamental para o desenvolvimento do CPT (Puxeddu et al. 2004) e pode ser detectada em material de paaf (Niemeier et al., 2012; Lassalle et al, 2010). A frequência da mutação do gene *BRAF* varia em trabalhos de diferentes regiões geográficas, de 30 a 80% (Xing,

2007; Jung et al, 2012; Sedliarou et al, 2004). No Brasil, somente um trabalho avaliando a frequência da mutação V600E do gene *BRAF* foi encontrado na literatura consultada. Nesse estudo, 32 casos de MCPT foram analisados e a frequência de mutação V600E do gene *BRAF* foi 38%, porém sem associação significativa com fatores clinicopatológicos (Oler et al 2009).

Embora nosso trabalho não tenha identificado associação significativa entre a mutação do gene *BRAF* e fatores clinicopatológicos, à exceção da tireoidite com a qual houve associação negativa, a frequência dessa mutação nos 80 casos analisados foi de 64,5%, confirmando sua importância na carcinogênese dos tumores papilares da tireóide, especialmente nos MCPT. A ausência de associação entre a mutação do gene *BRAF* e os fatores prognósticos do MCPT tem respaldo em outros trabalhos da literatura (Kim et al., 2005; Sobrinho-Simões et al., 2008). Era esperado que, pela importância da via MAPKinase, constitutivamente ativada, no carcinoma papilar de tireoide, que os pacientes com a mutação do gene *BRAF* apresentassem características de alto risco, notadamente extravasamento capsular e metástase linfonodal. Tal como descrito na tabela 1, somente dois estudos (Kim et al, 2005 e Sobrinho-Simões et al., 2005) não demonstraram esta associação. A importância da mutação *BRAF* foi realçada em trabalho publicado recentemente envolvendo 59 pacientes, o qual demonstrou que uma combinação de elementos anatomopatológicos (multifocalidade, fibrose, localização superficial do tumor) e a mutação do gene *BRAF* aumentou a sensibilidade da estratificação de risco (alto vs baixo grau) de 77% para 96% e a sensibilidade de 68% para 80% (Niemeier et al., 2012). Uma das limitações do nosso estudo é seu caráter retrospectivo, com seleção de casos submetidos a diferentes propedêuticas. Alguns representaram achados incidentais em pacientes operados por patologias benignas, cujos diagnósticos só foram confirmados após o exame anatopatológico da peça cirúrgica, enquanto outros tiveram diagnóstico previamente confirmado por meio de punção aspirativa classe III (indeterminada), IV (suspeita) ou V (carcinoma papilar), previamente ao ato cirúrgico. Alguns autores consideram os tumores diagnosticados por meio dessas duas diferentes formas como grupos heterogêneos e com comportamentos biológicos diferentes (Nucera e Pontecorvi, 2012). Além disso, estudos retrospectivos utilizam espécimes tumorais fixados em formol e incluídos em parafina, o que dificulta a obtenção de amostras de DNA íntegro e adequado para as análises moleculares, limitando o número de casos analisados.

A utilização de microdissecção do tumor poderia conferir maior uniformidade aos casos estudados, devido ao fato óbvio de evitar “contaminação” de tecido normal ou de outras patologias da glândula, que não o MCPT, adjacentes à lesão (Kim et al., 2010). Outra estratégia que poderia elucidar melhor as possíveis associações entre a mutação do gene *BRAF*^{V600E} e fatores de risco, neste estudo, seria o emprego da metodologia de sequenciamento gênico. Esta técnica representa o método eletivo para análise de mutações pontuais no DNA e todos os nossos casos deverão ser, em breve, testados por meio desta metodologia, a fim de compararmos os dois métodos (Lassalle et al, 2010; Kim et al.,2010).

Em nosso estudo, utilizando o método de PCR e RFLP, a mutação do gene *BRAF*^{V600E} foi detectada em 62,5% dos casos. A alta frequência da mutação *BRAF*^{V600E} nos MCPT, a exemplo do observado nos carcinomas papilares de maiores dimensões (CPT), sugere ser este um achado comum nesses tumores (Park et al., 2010), além de representar um evento precoce na carcinogênese papilar da tireóide (Park et al., 2010). A elucidação do mecanismo celular de transdução de sinais responsáveis pela transformação neoplásica das células tireoidianas permite a seleção de pacientes que podem ser beneficiados com o uso de novas drogas, as chamadas drogas alvo-dirigidas (Santoro, 2007). Inibidores de tirosina-quinases tais como BAY 43-9006, AAL-881 e LBT-613 são efetivas em inibir o crescimento de tumores de tireóide tanto *in vitro* como *in vivo* (Lassalle, 2010). Essas drogas não são seletivas para a proteína BRAF e podem atingir outras proteína-quinases integrantes de diversas cascatas sinalizadoras intracelulares. A droga BAY 43-9006 (Sorafenib; “Nexavar”) mostra atividade antitumoral relevante tanto nos pacientes com doença metastática quanto naqueles com resistência à captação de iodoradioativo. No entanto, estudos clínicos fase I-II mostraram resposta parcial em apenas 15% de pacientes com CPT metastático (Caronia et al, 2011).

Drogas seletivas contra *BRAF*^{V600E}, tais como SB-590885, PLX4720, PLX4032 apresentam uma ação inibitória sobre a atividade enzimática da BRAF quinase 100 vezes maior do que a droga BAY43-9006 (Lassalle et al, 2010 ; Santoro 2007). A droga PLX4032 (vemurafenib), um potente inibidor específico da proteína BRAF, mostrou ser efetiva no tratamento de melanoma metastático com 81% de regressão parcial ou completa numa coorte de 32 pacientes. Neste trabalho foram adicionados mais tres pacientes com carcinoma papilar de tireóide que também mostraram uma resposta completa ou parcial (Flaherty et al.; 2010). Um trabalho

demonstrou que após uma resposta parcial ao PLX4032, desenvolve-se uma resistência adquirida a esta droga quase que invariavelmente (Johannessen et al, 2010).

As novas drogas baseadas em inibidores específicos de BRAF^{V600E} representam um avanço no tratamento das doenças malignas da tireóide em um futuro próximo (Nucera e pontecovi, 2012).

VI - CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que a mutação V600E do gene BRAF é uma alteração genética comum nos microcarcinomas papilíferos de tireóide, podendo representar um evento precoce na carcinogênese da glândula tireóide.

Uma vez que, neste estudo, não foram observadas associações significativas entre a mutação V600E do gene BRAF e os aspectos clinicopatológicos dos microcarcinomas papilares de tireóide, as implicações clínicas desta mutação no prognóstico desses tumores não podem ser deduzidas.

Uma vez que a mutação V600E do gene BRAF foi altamente prevalente nos microcarcinomas papilares de tireóide avaliados neste estudo, sua utilização na confirmação diagnóstica dos microcarcinomas de tireóide é relevante, especialmente nos casos com diagnóstico citológico inconclusivo.

A presença da mutação V600E do gene BRAF nos microcarcinomas papilares de tireóide, não permite, entretanto, com base nos nossos resultados, mudar as condutas terapêuticas atuais.

Como perspectiva, novas drogas dirigidas à proteína BRAF poderão ter papel terapêutico relevante em pacientes selecionados, num futuro próximo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAREL, F. B.; CONTE-DEVOLX, et al. (2012). "From nodule to differentiated thyroid carcinoma: Contributions of molecular analysis in 2012." **Ann Endocrinol** (Paris) 73(3): 155-64.

ALBORES-SAAVEDRA, J. and J. Wu (2006). "The many faces and mimics of papillary thyroid carcinoma." **Endocr Pathol** 17(1): 1-18.

BALOCH, Z. W. and V. A. LIVOLSI (2007). "Our approach to follicular-patterned lesions of the thyroid." **J Clin Pathol** 60(3): 244-50.

BALOCH, Z. W.; LIVOLSI, V. A. (2008). "Diagnostic Terminology and Morphologic Criteria for Cytologic Diagnosis of Thyroid Lesions: A Synopsis of The National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference".

BARRET, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. (2010). **Ganong's Review of Medical Physiology**.

BELGE, G. L.; ROQUE, et al. (1998). "Cytogenetic investigations of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic findings and histology." **Cancer Genet Cytogenet** 101(1): 42-8.

BONGIOVANNI, M. P. M.; SADOW, et al. (2009). "Poorly differentiated thyroid carcinoma: a cytologic-histologic review." **Adv Anat Pathol** 16(5): 283-9.

BRADLY, D.; REDDY, P. et al. (2009). "Incidental papillary carcinoma in patients treated surgically for benign thyroid diseases." **Surgery** 146(6): 1099-104.

BURGER, AG (2004). "Environment and Thyroid function." **J Clin Endocrinol Metabolism** 89:1526.

BYRD, J. K.; YAWN, R. J. et al. (2012). "Well differentiated thyroid carcinoma: current treatment." **Curr Treat Options Oncol** 13(1): 47-57.

CARONIA et al. (2011). "Role of BRAF in thyroid oncogenesis". **Clin Cancer Res.** Dec 15;17(24):7511-7.

CERRATO, A.; DE FALCO, V. et al. (2009). "Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets." **J Mol Endocrinol** 43(4): 143-55.

CHIACCHIO, S.; LORENZONI, A. et al. (2008). "Anaplastic thyroid cancer: prevalence, diagnosis and treatment." **Minerva Endocrinol** 33(4): 341-57.

CLARK, O. H. (2010). Thyroid and Parathyroid in Current Diagnosis & Treatment: Surgery, Ed. McGraw-Hill Companies Inc.

COELI, C.; Brito, A. et al. (2005). "Incidência e Mortalidade por Câncer de Tiróide no Brasil." **Archivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo** 49(4).

COOPER, D. S.; DOHERTY, G. M. et al. (2009). "Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer." **Thyroid** 19(11): 1167-214.

CURADO, M. and MARTINS, E. (2006). "Incidência e Mortalidade dos Canceres de Cabeça e Pescoço no Brasil." **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço** 35(3): 136-41.

DAVIES, L.; OUELLETTE, M. et al. (2010). "The increasing incidence of small thyroid cancers: where are the cases coming from?" **Laryngoscope** 120(12): 2446-51.

DE MATOS, P. S.; FERREIRA, A. P. et al. (2006). "Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series." **Endocr Pathol** 17(2): 165-73.

DEAN, D. S. and GHARIB, H. (2008). "Epidemiology of thyroid nodules." **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 22(6): 901-11.

DELELLIS, R. e. al. (2004). WHO Classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of endocrine organs.

DURANTE, C.; PUXEDDU, E. et al. (2007). "BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism." **J Clin Endocrinol Metab** 92(7): 2840-3.

EYCHENE, A.; BARNIER, J. V., et al. (1992). "Chromosomal assignment of two human B-raf (Rmil) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rmil and B-raf-2, a processed pseudogene." **Oncogene** 7(8): 1657-60.

FLAHERTY, K. T.; Puzanov, I. et al. (2010). "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma." **N Engl J Med** 363(9): 809-19.

GINAT, D. T.; BUTANI, D., et al. (2010). "Pearls and pitfalls of thyroid nodule sonography and fine-needle aspiration." **Ultrasound Q** 26(3): 171-8.

HARACH, H. R.; FRANSSILA, K. O., et al. (1985). "Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study." **Cancer** 56(3): 531-8.

HAY ID (1990). "Papillary thyroid carcinoma". *EndocrinolClin North Am* 19:658-718

HUGHES, D. T.; HAYMART, M. R. et al. (2011). "The most commonly occurring papillary thyroid cancer in the United States is now a microcarcinoma in a patient older than 45 years." **Thyroid** 21(3): 231-6.

IMAIZUMI, M.; USA, T. et al. (2006). "Radiation dose-response relationships for thyroid nodules and autoimmune thyroid diseases in Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors 55-58 years after radiation exposure." **Jama** 295(9): 1011-22.

INCA. (2012). Estimativa 2012; Incidência de Câncer no Brasil, **Ministério da Saúde**.

JOHANNESSEN CM, BOEHM JS et al. (2011). "COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation." **Nature**, Dec 16; 468(7326):968-72

JUNG, C. K., S. Y. Im, et al. (2012). "Mutational Patterns and Novel Mutations of the BRAF Gene in a Large Cohort of Korean Patients with Papillary Thyroid Carcinoma." **Thyroid**.

KIM, S. W.; LEE, J. I., et al. (2010). "BRAFV600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population." **J Clin Endocrinol Metab** 95(8): 3693-700.

KIM, T. Y.; KIM, W. B. et al. (2005). "The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma." **Clin Endocrinol (Oxf)** 63(5): 588-93.

KIMURA, E. T.; NIKIFOROVA, M. N. et al. (2003). "High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma." **Cancer Res** 63(7): 1454-7.

KNOBEL, M. and MEDEIROS-NETO, G. (2004). "[Disorders associated to chronic iodine deficiency]." **Arq Bras Endocrinol Metabol** 48(1): 53-61.

KNAUF et al. (2003). "RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase." **Oncogene**, Jul 10; 22(28):4406-12.

KOLCH W, KOTWALIWALE A et al. (2002). "The role of BRAF Kinases in malignant transformation." **Expert Rev Mol Med.**; 2002:1-18

KWAK, J. Y.; KIM, E. K. et al. (2009). "Association of BRAFV600E mutation with poor clinical prognostic factors and US features in Korean patients with papillary thyroid microcarcinoma." **Radiology** 253(3): 854-60.

LANG, W.; BORRUSCH, H. et al. (1988). "Occult carcinomas of the thyroid. Evaluation of 1,020 sequential autopsies." **Am J Clin Pathol** 90(1): 72-6.

LASSALLE, S.; HOFMAN, V. et al. (2010). "Clinical impact of the detection of BRAF mutations in thyroid pathology: potential usefulness as diagnostic, prognostic and theragnostic applications." **Curr Med Chem** 17(17): 1839-50.

LEE, X.; GAO, M. et al. (2009). "Analysis of differential BRAF (V600E) mutational status in high aggressive papillary thyroid microcarcinoma." **Ann Surg Oncol** 16(2): 240-5.

LEENHARDT, L.; GROSCLAUDE, P. et al. (2004). "Increased incidence of thyroid carcinoma in france: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee." **Thyroid** 14(12): 1056-60.

LIN, X.; FINKELSTEIN, S. D. et al. (2008). "Molecular analysis of multifocal papillary thyroid carcinoma." **J Mol Endocrinol** 41(4): 195-203.

LIU, D.; HU, S., et al. (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): 1341-9.

MARCHETTI, I.; IERVASI, G. et al. (2012). "Detection of the BRAF (V600E) mutation in fine needle aspiration cytology of thyroid papillary microcarcinoma cells selected by manual macrodissection: an easy tool to improve the preoperative diagnosis." **Thyroid** 22(3): 292-8.

MARQUES, A. R.; ESPADINHA, C. et al. (2002). "Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas." **J Clin Endocrinol Metab** 87(8): 3947-52.

MELCK, A. L.; YIP, L. et al. (2010). "The utility of BRAF testing in the management of papillary thyroid cancer." **Oncologist** 15(12): 1285-93.

MERCANTE, G.; FRASOLDATI, A. et al. (2009). "Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients." **Thyroid** 19(7): 707-16.

MOLINA, P. E. (2006). *Endocrine Physiology*, **McGraw-Hill Companies Inc.**

NCBI "On line Mendelian Inheritance in Man."

NIEMEIER, L. A.; KUFFNER AKATSU, H., et al. (2012). "A combined molecular-pathologic score improves risk stratification of thyroid papillary microcarcinoma." **Cancer** 118(8): 2069-77.

NIKIFOROV, Y. E. (2002). "RET/PTC rearrangement in thyroid tumors." **Endocr Pathol** 13(1): 3-16.

NIKIFOROV, Y. E. (2004). "Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas." **Endocr Pathol** 15(4): 319-27.

NIKIFOROVA, M. N.; LYNCH, R. A. et al. (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): 2318-26.

NUCERA, C.; Pontecorvi, A. (2012). "Clinical outcome, role of BRAF (V600E), and molecular pathways in papillary thyroid microcarcinoma: is it an indolent cancer or an early stage of papillary thyroid cancer?" **Front Endocrinol (Lausanne)** 3: 33.

OLER, G. and CERUTTI, J. M. (2009). "High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes." **Cancer** 115(5): 972-80.

PARAMESWARAN, R.; BROOKS, S. et al. "Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers (2010).."
Int J Surg 8(3): 186-93.

PARK, Y. J.; KIM, Y. A. et al. (2010). "Papillary microcarcinoma in comparison with larger papillary thyroid carcinoma in BRAF(V600E) mutation, clinicopathological features, and immunohistochemical findings." **Head Neck** 32(1): 38-45.

PISANU, A.; CHIARA, B. Di, et al. (2010). "Oncocytic cell tumors of the thyroid: factors predicting malignancy and influencing prognosis, treatment decisions, and outcomes." **World J Surg** 34(4): 836-43.

PISANU, A.; RECCIA I. et al. (2009). "Risk factors for nodal metastasis and recurrence among patients with papillary thyroid microcarcinoma: differences in clinical relevance between nonincidental and incidental tumors." **World J Surg** 33(3): 460-8.

POLLOCK, P. M. and MELTZER, P. S. (2002). "Lucky draw in the gene raffle." **Nature** 417(6892): 906-7.

PUXEDDU, E.; MORETTI S. et al. (2004). "BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas." **J Clin Endocrinol Metab** 89(5): 2414-20.

REIS, D. A.; INES; CURADO, Maria Paulo; OLIVEIRA, José Carlos (2008). "Cancer de tireoide em Goiânia: estudo descritivo populacional no período de 1988 a 2003." **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço** 37(2): 62-66.

ROQUE, L.; RODRIGUES, R. et al. (2003). "Chromosome imbalances in thyroid follicular neoplasms: a comparison between follicular adenomas and carcinomas." **Genes Chromosomes Cancer** 36(3): 292-302.

ROTI, E.; DEGLI UBERTI, E. C. et al. (2008). "Thyroid papillary microcarcinoma: a descriptive and meta-analysis study." **Eur J Endocrinol** 159(6): 659-73.

SANTORO, M. F., A. (2007). "New Drugs in Thyroid Cancer." **Arq Bras Endocrinol Metab** (51/5): 857-861.

SEDLIAROU, I.; SAENKO, V., et al. (2004). "The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma." **Int J Oncol** 25(6): 1729-35.

SHATTUCK, T. M.; WESTRA, W. H., et al. (2005). "Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma." **N Engl J Med** 352(23): 2406-12.

SHEU, S. Y.; and SCHMID, K. W. (2003). "[Inflammatory diseases of the thyroid gland. Epidemiology, symptoms and morphology]." **Pathologe** 24(5): 339-47.

SIPOS, J. A. and Mazzaferri, E. L. (2010). "Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables." **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 22(6): 395-404

SITHANANDAM, G.; KOLCH, W. et al. (1990). "Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies." **Oncogene** 5(12): 1775-80.

SMALLRIDGE, R. C.; MARLOW, L. A. et al. (2009). "Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies." **Endocr Relat Cancer** 16(1): 17-44.

SOBRINHO-SIMOES, M.; MAXIMO, V. et al. (2008). "Intragenic mutations in thyroid cancer." **Endocrinol Metab Clin North Am** 37(2): 333-62, viii.

TROVISCO, V.; SOARES, P. et al. (2005). "Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness." **Virchows Arch** 446(6): 589-95.

WARTOFSKY, L. (2010). "Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure?" **Hormones (Athens)** 9(2): 103-8.

WOJCIECHOWSKA, K. and Lewinski, A. (2006). "BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma." **Endocr Regul** 40(4): 129-38.

XING, M. (2005). "BRAF mutation in thyroid cancer." **Endocr Relat Cancer** 12(2): 245-62.

XING, M. (2007). "BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications." **Endocr Rev** 28(7): 742-62.

XING, M. (2009). "BRAF mutation in papillary thyroid microcarcinoma: the promise of better risk management." **Ann Surg Oncol** 16(4): 801-3.

XING, M.; CLARK, D. et al. (2009). "BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer." **J Clin Oncol** 27(18): 2977-82.

XING, M.; TUFANO, R. P. et al. (2004). "Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer." **J Clin Endocrinol Metab** 89(6): 2867-72.

ZABLOTSKA, L. B.; RON, E., et al. (2011). "Thyroid cancer risk in Belarus among children and adolescents exposed to radioiodine after the Chernobyl accident." **Br J Cancer** 104(1): 181-7.

ANEXO - PROTOCOLO

PROTOCOLO CEP/ACCG Nº 059/09

Goiânia, 07/12/2009

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dr. Antonio Paulo Machado Gontijo

TÍTULO: “Avaliação molecular do Gene Braf como fator prognóstico do microcarcinoma papilar da tireóide”.

Área Temática: Grupo I – Genética Humana

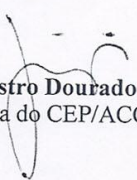
Área de Conhecimento: Ciências Biológicas

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG – Anatomia Patológica e Dept. de Cabeça e Pescoço

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, **relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões), resultados e publicação (ões).


Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi
Coordenadora do CEP/ACCG



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

(62) 3878-7000 | 3243-7000
Rua 239, nº 206, St. Universitário
Goiânia · Goiás · Brasil · CEP 74.605-070
www.accg.org.br



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ☉ Setor Universitário
Caixa Postal 86 ☉ CEP 74605-010
Goiânia ☉ Goiás ☉ Brasil
Fone: (62) 3946.1070 ☉ Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br ☉ prope@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 29 DE AGOSTO DE 2012 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

.....300 (Dez)

Vera Aparecida Saddi

.....
Dr^a. Vera Aparecida Saddi - PUC Goiás
(presidente orientadora)

.....
Dr. Wilmar José Manoel - ACCG
(membro)

.....
Dr^a. Rejane da Silva Sena Barcelos - PUC Goiás
(membro)