



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

ROSANA CORRÊA DA SILVA

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO V600E DO GENE *BRAF* E DETECÇÃO
IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA BRAF EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREÓIDE**

ORIENTADORA: Prof^ª Dra. Vera Aparecida Saddi

GOIÂNIA-GO
2012

ROSANA CORRÊA DA SILVA

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO V600E DO GENE *BRAF* E DETECÇÃO
IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA BRAF EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS 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

GOIÂNIA-GO

2012

Silva, Rosana Corrêa.

S586a Análise da Mutação V600E do Gene *BRAF* e Detecção
Imuno-Histoquímica da Proteína BRAF em Carcinomas
Papilíferos da Tireóide [manuscrito] / Rosana Corrêa da Silva.
– 2012.

79 f.: il. ; 30 cm.

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

“Orientadora: Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi”.

1. Glândula tireóide. 2. Imunohistoquímica. I. Título.

CDU: 616.441(043)



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

Av. Universitária, 1.009 - Setor Universitário
Cidade Frontal 88 - CEP 74006-010
Goiânia - Goiás - Brasil
Fone: (62) 3246.1070 - Fax: (62) 3246.1070
www.pucgoias.edu.br - prope@pucgoias.edu.br

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 28 DE MARÇO DE 2012 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA**

10 (..... *Dez*))

Vera Aparecida Saddi

Profª Drª Vera Aparecida Saddi - PUC Goiás
(presidente-orientadora)

Renata B A Soares

Profª Drª Renata de Bastos Ascenço Soares / PUC Goiás
(membro interno)

Sérgio Henrique Nascente Costa

Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa
(membro externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida, por minha saúde e pela possibilidade de aquisição de conhecimento e crescimento constante.

A Dra Vera Saggi minha orientadora e amiga, quero expressar a minha gratidão por ter sido incansável na orientação que me deu ao longo de todo o trabalho, por ter estabelecido um elevado nível de exigência que foi fundamental para a minha formação, por estar sempre presente e disponível, pelo apoio e pela amizade, e por ser um exemplo excelente do que é trabalhar em pesquisa, com honestidade e ética, razões pelas quais merece minha total admiração.

Aos meus amigos do laboratório de Imuno-histoquímica do Hospital Araújo Jorge, Karla e Gustavo, e do laboratório de Diversidade Genética da PUC-GO, Caio e Brhuna, agradeço muito pelo incentivo, ajuda e eficácia que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos médicos do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, Dra Rita de Cássia pela amizade e ajuda valorosa; Dr Ailton; Dr Élbio; Dra Eliane; Dr Henrique e Dra Luciana pela colaboração no trabalho. Agradeço também ao Dr Alexandre Meneghini do Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge por sua disponibilidade e ajuda.

À minha mãe, por ser o principal pilar da minha vida e a quem devo o que sou até hoje. Ao meu pai Ruy que infelizmente já não está entre nós, mas que foi e sempre será extremamente importante em minha vida por ter sido um pai exemplar, por ter me incentivado a atingir objetivos mais altos.

Aos professores que aceitaram fazer parte da banca, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os carcinomas papilíferos são os tumores mais comuns da tireóide, sendo responsáveis por 80% de todos os cânceres da glândula. Nesses tumores, uma mutação comum no gene *BRAF* tem sido observada, compreendendo a transversão do nucleotídeo T1799A, localizado no exon 15, verificada em 50% dos carcinomas papilíferos de tireóide (CPT). Essa mutação acarreta a substituição do aminoácido valina na posição 600 da proteína, por ácido glutâmico, sendo assim designada V600E. Estudos experimentais e clínicos têm mostrado uma associação entre a mutação do gene *BRAF* e diferentes parâmetros clínicos de progressão, invasão e recorrência no CPT. O objetivo deste estudo foi detectar os níveis da proteína BRAF utilizando o método de imuno-histoquímica, e avaliar a mutação V600E do gene *BRAF* em um grupo de pacientes com carcinoma papilífero de tireóide. A detecção imuno-histoquímica da proteína BRAF e a mutação V600E do gene *BRAF*, foram comparadas em relação aos aspectos clínico-patológicos dos tumores. O grupo de estudo incluiu 116 pacientes com carcinoma papilífero de tireóide, selecionados no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia-GO. A análise imuno-histoquímica utilizou o método da imunoperoxidase associada a polímeros e o anticorpo BRAF (clone F-7) Santa Cruz *Biotechnology Inc.* A análise molecular da mutação V600E do gene *BRAF* foi realizada por meio de PCR (reação em cadeia da polimerase) e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). As análises estatísticas incluíram o teste do Chi-quadrado com correção de Yates e o teste exato de Fisher. Nossos resultados mostraram que a hiperexpressão de BRAF foi detectada em 54 casos (46%) e a mutação V600E do gene *BRAF* em 74 casos (63,8%). Dentre as associações investigadas, resultados significativos foram observados entre a hiperexpressão da proteína BRAF e extensão extra-tireoideana do tumor ($p=0,0183$). A presença da mutação V600E do gene *BRAF* foi associada as metástases linfonodais ($p=0,0385$) e à hiperexpressão da proteína BRAF ($p=0,0063$).

Palavras-Chaves: BRAF; mutação V600E; proteína BRAF; Carcinoma papilífero de tireóide.

ABSTRACT

Papillary carcinomas are the most common tumors of the thyroid, corresponding to 80% of all tumors that affect the gland. In such tumors, a common mutation at the *BRAF* gene has been detected, comprising a nucleotide transversion, T1799A, at the exon 15 of gene. This mutation has been identified in about 50 % of the thyroid papillary carcinomas (TPC). Clinical and experimental studies have demonstrated important associations between *BRAF* mutations and different TPC clinical factors related to tumor progression, invasion and recurrence. The objective of this study was to analyse *BRAF* protein expression, by using immunohistochemistry, and V600E *BRAF* mutations in a group of patients with thyroid papillary carcinoma. *BRAF* protein expression and V600E *BRAF* mutations were compared to TPC clinical and pathological aspects. The study group comprised 116 TPC patients that were selected at the Pathology Department of Hospital Araujo Jorge, in Goiânia. *BRAF* immunohistochemical analysis employed a labeled polymer peroxidase method and primary *BRAF* monoclonal antibody (clone F-7), Santa Cruz *Biotechnology Inc.* *BRAF* V600E molecular analysis was carried by PCR (Polimerase Chain Reaction) associated to RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Statistical analysis was performed by using univariate analysis (Chi-square test with Yates correction, and Fischer). Our results indicated that *BRAF* overexpression was detected in 54 TPC cases (46.0%), while *BRAF* V600E mutation was detected in 74 TPC cases (63.8%). Significant associations were detected between *BRAF* overexpression with distant metastasis ($p=0.001$) and tumor extrathyroidal extensions ($p=0.0183$). *BRAF* V600E mutations were significantly associated with lymph nodes methastasis ($p=0.0385$) and *BRAF* protein overexpression ($p=0.0063$).

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Alterações moleculares no Carcinoma Papilífero da Tireóide.....	30
FIGURA 2. Localização do gene <i>BRAF</i> no cromossomo 7	30
FIGURA 3. Representação esquemática do gene <i>BRAF</i>	31
FIGURA 4. A proteína BRAF.....	31
FIGURA 5. Via Intracelular da MAPK	33
FIGURA 6. Mecanismo molecular da mutação V600E do gene <i>BRAF</i>	35
FIGURA 7. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)	50
FIGURA 8. Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico negativo para a expressão de BRAF em carcinoma papilífero de tireóide (aumento x100)	51
FIGURA 9. Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico para a detecção de BRAF em menos de 50% das células tumorais de carcinoma papilífero de tireóide (aumento x100)	51
FIGURA 10. Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico para a detecção de BRAF em 50% ou mais das células tumorais de carcinoma papilífero de tireóide (aumento x100)	52
FIGURA 11. Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico da detecção de BRAF em 50% ou mais das células tumorais de carcinoma papilífero de tireóide (aumento x200)	52
FIGURA 12. Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata, mostrando produtos de restrição de um fragmento do gene <i>BRAF</i> com 224 pares de bases, contendo ou não a mutação T1796A, cortado com a enzima <i>TspRI</i>	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Revisão de artigos científicos que demonstraram associações entre a mutação V600E de <i>BRAF</i> e metástase nos CPT	37
TABELA 2. Revisão de artigos científicos que não demonstraram associações entre a mutação V600E de <i>BRAF</i> e metástase nos CPT	38
TABELA 3. Descrição dos primers e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para amplificação do gene <i>BRAF</i> em amostras de carcinoma papilífero da tireóide	48
TABELA 4. Possíveis associações investigadas entre os aspectos clínicos e a expressão da proteína BRAF em 116 pacientes com carcinoma papilífero da tireóide .	54
TABELA 5. Possíveis associações investigadas entre os aspectos clínicos e a presença da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> em 116 pacientes com carcinoma papilífero da tireóide	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás

A-Raf - isoforma A da proteína Raf

AKAP9/BRAF- fusão dos genes *BRAF* e *AKAP9*

AUC - do inglês: *area under the curve*

BRAF - isoforma B da proteína Raf

BRAF - 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

BRAFVK600-1E - substituição dos aminoácidos valina e lisina por ácido glutâmico nos códons 600 e 601 da proteína BRAF

C-Raf - isoforma C da proteína Raf

CAT - Carcinoma Anaplásico da Tireóide

CEP - Comitê de ética e pesquisa

CDT - Carcinoma Diferenciado da Tireóide

CFT - Carcinoma Folicular da Tireóide

CMT - Carcinoma Medular da Tireóide

CPT - Carcinoma Papilífero da Tireóide

CPTVED - Carcinoma papilífero da tireóide – variante esclerosante difusa

CPTVF - Carcinoma papilífero da tireóide – variante folicular

CR1 - domínio rico em cisteína da proteína RAF

CR2 - domínio rico em serina e treonina da proteína RAF

CR3 - domínio quinase da proteína RAF

C-RAF - isoforma C da proteína RAF

Curva ROC - do inglês: *Receiver Operating Characteristic*

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato

ERK - quinase regulada por sinal extracelular

HAI - Hospital Araújo Jorge

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MAPK - via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos

MEK - MAPK/ERK quinase

NCDB - *do inglês: National Cancer Data Base*

NIS - proteína trocadora de iodeto e sódio (do inglês: *sodium iodide symporter*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAAF - punção aspirativa com agulha fina

Pb - pares de bases

PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

pH - potencial hidrogeniônico

r.p.m - rotações por minuto

RAF - proteína RAF

RAS - proteína RAS

RCBP - Registro de Câncer de Base Populacional

RET - gene do receptor para fator de crescimento neurotrófico derivado de célula

RET/PTC - rearranjos do gene *RET* com genes heterólogos

RET/PTC1 - rearranjo formado pela fusão dos genes *H4* ou *D10S170* com o gene *RET*

RET/PTC3 - rearranjo formado pela fusão dos genes *RFG* ou *ELE1* com o gene *RET*

RFLP-PCR - reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.

SAP - Setor de Anatomia Patológica

SEER - *do inglês: Cancer Institute Surveillance Epidemiology End Results*

T1799A - transversão de timina para adenina no nucleotídeo 1799 do gene *BRAF*

T3 - hormônio tireoideano triiodotironina

T4 - hormônio tireoideano tetraiodotironina

TNM - Tumor, Nódulos (metástases linfonodais), Metástases à distância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 História Natural do Câncer da Tireóide	14
1.2 Epidemiologia do câncer da tireóide	17
1.3 Fatores de risco para o desenvolvimento dos CPT	20
1.4 Classificação Histológica dos CPT	23
1.5 Fatores Prognósticos para o CPT	26
1.6 Patologia Molecular do CPT	28
1.7 O Gene <i>BRAF</i>	30
1.8 A Proteína BRAF	31
1.9 Via Intracelular da MAPK	32
1.10 Mutação V600E de <i>BRAF</i>	34
1.11 Revisão de artigos científicos que demonstraram associações entre a mutação V600E de <i>BRAF</i> e metástase nos CPT	37
1.12 Revisão de artigos científicos que não demonstraram associações entre a Mutação V600E de <i>BRAF</i> e metástase nos CPT	38
1.13 Significado Clínico da Mutação V600E	38
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos:.....	41
3. Metodologia	42
3.1 Aspectos éticos da pesquisa	42
3.2 Seleção de casos de carcinoma papilífero de tireóide:	42
3.3 Imuno-histoquímica	43
3.4 Extração de DNA das amostras de carcinomas papilíferos de tireóide:	45

3.4.1	Preparo das amostras	45
3.4.2	Lise celular	46
3.4.3	Precipitação de proteínas.....	46
3.4.4	Precipitação do DNA	46
3.4.5	Hidratação do DNA	47
3.5	Análise molecular da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> por meio de PCR e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição):	47
3.6	Análise Estatística	48
4.	RESULTADOS	49
4.1	Grupo de Estudo	49
4.2	Análise imuno-histoquímica da expressão de BRAF nos carcinomas papilíferos de tireóide.....	49
4.3	Análise da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> nos carcinomas papilíferos de tireóide	53
4.4	Análise das possíveis associações entre a detecção imuno-histoquímica de BRAF e os aspectos clínico-patológicos dos carcinomas papilíferos de tireóide	53
4.5	Análise das possíveis associações entre a presença da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> e os aspectos clínico-patológicos dos carcinomas papilíferos de tireóide	54
5.	DISCUSSÃO	56
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
7.	REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

A glândula tireóide é um importante órgão especializado na função endócrina do corpo humano. Sua função é sintetizar uma quantidade suficiente de hormônios tireoideanos, a tetraiodotironina (T4), seu principal produto secretório e a triiodotironina (T3), produzida principalmente a partir da conversão periférica de T4 (Meyer et al, 2007). Os hormônios tireoideanos promovem crescimento e desenvolvimento fisiológico e regulam várias funções do organismo, como a produção de energia e calor. Além disso, as células parafoliculares da tireóide secretam calcitonina, substância importante na fisiologia do cálcio. Os hormônios da tireóide são peculiares porque contêm 59 a 65% do oligoelemento iodo (Willians et al, 1998).

A glândula tireóide é formada por dois lobos laterais ligados por um istmo e pesa cerca de 20g. Os lobos são constituídos por folículos, delimitados por uma camada única de células epiteliais, cuja luz é preenchida por material colóide. Está localizada na região anterior do pescoço e apresenta como função, regular praticamente todo o metabolismo do corpo humano. Existem inúmeras doenças que podem acometer a tireóide e aproximadamente 5% da população apresentam algum tipo de sintoma (Harrison 2002).

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina maligna mais frequente (Weber et al, 2005; Salvatore et al, 2006, Sipos et al, 2010) e compreende cerca de 1% de todos os cânceres humanos. Os carcinomas de tireóide são classificados de acordo com parâmetros histológicos e clínicos. Podem apresentar-se como tumores bem-diferenciados (carcinomas papilíferos, carcinomas foliculares), indiferenciados (anaplásicos) e medulares. Os carcinomas papilíferos da tireóide (CPT) são os mais comuns e representam cerca de 80% dos casos (Meyer et al, 2007, Gheriani et al, 2006).

A mutação V600E do gene *BRAF*, comumente estudada nos CPT, resulta em ganho de função e ativação constitutiva da via MAPK (kinase ativada por mitógeno). Acredita-se que a hiperexpressão de *BRAF* também possa resultar em hiperativação da via MAPK (Feng et al, 2011). Estudos de expressão gênica do *BRAF* podem

fornecer informações acerca do envolvimento desse gene na patogênese dos tumores papilíferos de tireóide (Nikiforov et al, 2011). A identificação de fatores prognósticos mais precisos para os carcinomas papilíferos de tireóide, com a avaliação da expressão da proteína BRAF por imuno-histoquímica e da Mutação V600E do gene *BRAF* podem possibilitar aos pacientes novas condutas diagnósticas e terapêuticas (Brose et al, 2010).

1.1 História Natural do Câncer da Tireóide

A prevalência de nódulos tireoideanos clinicamente palpáveis, que constituem, na maioria dos casos, a forma de apresenta o inicial do câncer de tireóide, é de 2–7% na popula o normal adulta (Salvatore et al, 2004; Quiros et al, 2005; Weber et al, 2005). Com o uso da ultrassonografia e de outras técnicas sensíveis de imagem, chega-se a detectar nódulos palpáveis e não-palpáveis em 50% dessa mesma popula o, mas apenas 5-10% do total dos nódulos encontrados são malignos (Coeli et al, 2005).

Até alguns anos atrás, além da anamnese, do exame clínico incluindo a palpa o e dos exames laboratoriais, era obrigatória na semiologia do nódulo tireoideano a chamada cintilografia, que consta da administra o de iodo radioativo, seguida pelo mapeamento da tireóide, que é marcada pela reten o do radioisótopo em suas células foliculares. De acordo com a quantidade de sinais radioativos emitidos, o nódulo é referido como quente, quando a quantidade de marcador   maior do que aquela presente no restante da glândula, morno para quantidades iguais e frio quando há menos marcador no nódulo do que no restante do parênquima. Tumores malignos são encontrados em 5% dos pacientes com nódulos quentes, em 9% dos nódulos mornos e em cerca de 15% dos nódulos frios. Por este motivo, todos os pacientes portadores de nódulo frio eram encaminhados à cirurgia para diagnóstico definitivo através do estudo anatomopatológico. Em alta porcentagem destes pacientes, no entanto, o estudo histológico das tireoidectomias evidenciava lesões totalmente benignas (Meier et al, 2001).

Em geral para a tireóide desenvolver sua atividade fisiológica, exige uma dosagem mínima de iodo para seu consumo: aproximadamente 200 microgramas/dia (Harrison 2002). A necessidade de iodo para o ser humano depende de algumas variáveis: idade, sexo, estado gestacional ou período de lactação, calor e umidade regional, além de hábitos individuais de adição de sal ao alimento. No Brasil, até o início da década de 80, o iodo não era adicionado ao sal, mas a partir de 1982, toda a população brasileira recebe uma quantidade mínima de iodo no sal por conta de avanços na legislação. A lei 6.150 de dez/1974 responsabilizava o beneficiador do sal pela iodatação e, em 1983, o subsídio e o controle do sal de consumo humano passaram a ser de obrigatoriedade do Ministério da Saúde, regulamentado somente em 16/03/95 pela lei 9.005. Posteriormente, a Portaria 218 de 24/03/99 estabeleceu o teor de iodo no sal para consumo humano, 40 a 100 miligramas de iodo por quilograma do produto, 1 g de sal possui 25 mcg de iodo (Clerici, 2004). Existem evidências experimentais, clínicas e, sobretudo epidemiológicas, de que a ingestão de iodo esteja relacionada à incidência desses tumores (Knobel et al, 2007).

Os nódulos tireóideos podem fazer parte de doenças benignas como o bócio colóide adenomatoso e as tireoidites, assim como de doenças neoplásicas. O grande dilema do clínico é diferenciar os nódulos benignos dos malignos e selecionar os pacientes que devem ser encaminhados para tratamento cirúrgico.

O CPT clássico é um tumor bem-diferenciado e associado a um bom prognóstico, sendo facilmente curável com cirurgia e tratamentos médicos convencionais. Porém, alguns fatores como idade avançada, gênero masculino, maior tamanho do tumor, ausência de cápsula tumoral, extensão extra-tireoideana, metástases linfonodais e metástases a distância estão associados a uma evolução mais agressiva da neoplasia (Lee et al, 2007; Basolo et al, 2010). Um padrão de crescimento infiltrativo, multicêntrico e com disseminação regional para linfonodos é frequentemente encontrado, mas não altera o bom prognóstico atribuído ao CPT. A multifocalidade ocorre em 25-65% dos casos e embora seja atribuída tradicionalmente às metástases intraparenquimatosas, sabe-se que pode também originar-se a partir de precursores independentes. A recorrência em linfonodos locais no pescoço está presente em 30-66% dos pacientes, enquanto a metástase à

distância é encontrada em 5-10%, principalmente em pulmão e ossos (Basolo et al, 2010).

Os sintomas potencialmente indicativos de paralisia das cordas vocais, incluindo rouquidão, disfagia e odinofagia são especialmente importantes no diagnóstico dos CPT. Além disso, o médico pergunta ao paciente sobre tosse, falta de ar, estridor, ou hemoptise, que podem sugerir invasão traqueal por um carcinoma da tireóide. A perda de peso significativa ou desconforto sistêmico, bem como qualquer doença anterior da tireóide, também são sintomas discutidos durante o processo de levantamento da história da doença (Slough et al, 2006).

Na infância, a exposição à radiação ionizante na região de cabeça e pescoço permanece como o único fator exógeno claramente associado com o aparecimento de tumores benignos e malignos da tireóide, quase exclusivamente tumores papilíferos (CPT) (Gimm 2001; Coeli et al, 2005). A radiação ionizante externa com fins diagnósticos ou terapêuticos, particularmente durante a infância ou adolescência, para condições benignas de cabeça e pescoço, está associada a um risco aumentado de desenvolvimento do câncer de tireóide (Bucci et al, 2001, Reis et al, 2008). Entre as décadas de 1920 e 1950, antes dos médicos saberem o perigo dos raios X, a radioterapia foi frequentemente utilizada no tratamento de adenóides, hipertrofia de amígdalas, adenite cervical, mastoidite, sinusite, hemangioma, tinea capitis e acne. Observou-se, então, forte relação entre o desenvolvimento do câncer de tireóide e história de irradiação de cabeça e pescoço, com período de latência de cinco anos ou mais. A radiação ionizante é o único fator reconhecidamente causador de carcinoma diferenciado de tireóide, mas é possível que a exposição transitória a outros fatores físicos também seja carcinogênica.

É interessante observar que as moléstias da tireóide são muito mais frequentes nas mulheres do que nos homens. É possível que fatores hormonais expliquem tal predominância feminina já que antes da puberdade e após a menopausa, a incidência destes tumores tende a se aproximar da do sexo masculino (Coeli et al, 2005; Ward et al, 2007).

1.2 Epidemiologia do câncer da tireóide

Aumentos significativos da incidência de carcinomas da tireóide têm sido registrados em todo o mundo. Este tipo de câncer representa cerca de 1% de todos os cânceres humanos e apresenta heterogeneidade em termos histológicos, na apresentação clínica e prognóstico (Puxeddu et al, 2004). As taxas de incidência ajustadas por idade variam consideravelmente entre populações de diversas localizações geográficas ao redor do mundo, em sua maioria situando-se entre 0,5-10/100.000. Em algumas localidades, porém, altas taxas de incidência têm sido encontradas, como na Islândia, Havaí e Israel (8,5- 19,4/ 100.000)(Kondo et al, 2006).

Entre os gêneros observa-se uma variação de incidência, de 2-4 vezes mais alta em mulheres jovens (25-50 anos), englobando 70% dos casos e sendo um dos cinco tipos de câncer mais comuns nesse grupo (SaKoda et al, 2002, Reis et al, 2008, Giusti et al, 2010). Entretanto, essa incidência decresce após a menopausa, provavelmente pelo envolvimento de fatores hormonais (Ward et al, 2008). Apesar de ser considerada uma doença relativamente rara, o câncer de tireóide é uma das poucas doenças malignas cuja incidência tem aumentado nas últimas décadas, principalmente nos países desenvolvidos, sem que haja uma causa claramente conhecida para este aumento (Zabel et al, 2006). Tal fato pode ser o reflexo de um aumento de riscos ambientais e/ou de eficiência diagnóstica para esses tumores, que passam a ser detectados mais precocemente (Smalyte et al, 2006). Esta última hipótese tem sido a mais aceita, uma vez que ao diagnóstico tem-se verificado uma diminuição do tamanho dos tumores detectados e uma prevalência maior de tipos histológicos menos agressivos (Trimboli et al, 2006).

Apesar do crescimento na taxa de incidência do câncer de tireóide, principalmente em mulheres, as taxas de mortalidade permanecem baixas e têm sofrido uma diminuição nos últimos anos (Trimboli et al, 2006), não estando incluídas entre as maiores taxas de mortalidade por câncer, em ambos os gêneros. O projeto GLOBOCAN estimou, para o ano de 2002, taxas de mortalidade ajustadas por idade no sexo feminino de 0,5/100.000 nas regiões mais desenvolvidas e de

0,8/100.000 nas regiões menos desenvolvidas. A estimativa da taxa de mortalidade na população masculina foi a mesma nas duas regiões, sendo igual a 0,4/100.000 (Coeli et al, 2005).

O projeto GLOBOCAN estimou para o ano de 2002 a ocorrência de 141.013 casos novos de câncer de tireóide no mundo e de 35.575 óbitos por essa causa. Estes números correspondem à estimativa da taxa de incidência do câncer de tireóide ajustada para idade, em mulheres de 5,5/100.000 nas regiões desenvolvidas (América do Norte e Europa) e de 2,6/100.000 nas regiões menos desenvolvidas (África e América do Sul). Para os homens, as estimativas foram de 2,1/100.000 e de 1,0/100.000 (Coeli et al, 2005) em regiões desenvolvidas e menos desenvolvidas, respectivamente. De acordo com essas estimativas, a taxa de incidência do câncer de tireóide, ajustada por idade, por gênero e localização global encontra-se mais alta na América do Norte e apresenta-se baixa em todas as partes da África.

Nos Estados Unidos, estimou-se que 37.200 pessoas (10.000 homens e 27.200 mulheres), foram diagnosticadas com câncer de tireóide em 2009 (Tang et al, 2010). O câncer diferenciado da tireóide ocupa atualmente, nos Estados Unidos, a oitava posição entre as neoplasias mais frequentes na mulher. Este aumento atingiu níveis de 6,3% ao ano entre 1997 e 2003 [*Surveillance, Epidemiology, End Results Program* (SEER)- dados disponíveis no site da *American Cancer Society*]. Registros nacionais de câncer (Instituto Nacional do Câncer-INCA), dados dos registros de base populacional e publicações brasileiras confirmam o aumento destas neoplasias, particularmente entre as mulheres. Embora, à semelhança do registrado em todo mundo, também no Brasil a mortalidade está diminuindo (Coeli et al, 2005).

Deve-se considerar o fato de que a incidência do câncer de tireóide no Brasil não é desprezível e tem crescido, seguindo uma tendência de elevação reconhecida em várias partes do mundo e tem se mantido nas últimas décadas, principalmente nos países desenvolvidos (Ward 2007). No Brasil, o câncer de tireóide correspondeu a 1,3% de todos os casos de câncer registrados no Instituto Nacional do Câncer (Ministério da Saúde-INCA) de 1994 a 1998, e a 6,4% de todos os cânceres da cabeça e pescoço, nesse mesmo período (MS/INCA, 2006). Alguns locais apresentam valores que se aproximam aos verificados no projeto GLOBOCAN para as regiões desenvolvidas (São Paulo, Goiânia, Distrito Federal), enquanto outros

apresentam valores que se aproximam daqueles verificados para regiões menos desenvolvidas (Belém, Recife, Salvador e Porto Alegre). Ao se observar, nos últimos anos, as taxas de incidência ajustadas por idade, em homens, observa-se uma variação de 0,7/100.000 em Belém até 3,0/100.000 em São Paulo (razão = 4,3). Essas cidades também apresentaram, respectivamente, as mais baixas (0,8/100.000) e as mais altas (10,9/100.000) taxas de incidência ajustadas por idade entre as mulheres (Coeli et al, 2005) .

No Brasil, as tendências de queda de mortalidade e de aumento de incidência do câncer de tireóide nas últimas décadas, a exemplo do que se verifica em todo mundo, são provavelmente explicadas pela maior disponibilidade e avanços tecnológicos de recursos médicos, representados principalmente pela ampla utilização de exames ultrassonográficos e citologias em material obtido de nódulos tireoideanos por punção aspirativa com agulha fina (PAAF). Tais recursos possibilitam um aumento da capacidade de triagem e detecção mais precoce de tumores menos agressivos, monitoramento mais eficaz de condições tireoidianas benignas e malignas, com maior chance de tratamento rápido das recidivas e metástases, o que resulta em um aumento da sobrevida dos pacientes (Coeli et al, 2005; Ward 2005). Outros fatores como influências ambientais e alterações moleculares devem ser levados em conta para explicar também o aumento da incidência destes tumores (Xing, 2010).

Em Goiânia, as maiores taxas são registradas para as mulheres, com uma incidência bruta que variou de 7,28, no ano 2000 para 10,50, em 2005 (Coeli et al, 2005). As causas desse aumento são discutíveis, mas em parte podem ser atribuídas à melhor disponibilidade dos serviços médicos, bem como ao uso rotineiro da ultrassonografia nos consultórios, aliada à difusão da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos nódulos encontrados, mesmo que pequenos (Kent et al, 2007). Possíveis associações entre o aumento da incidência e fatores como exposição às radiações ionizantes e hábitos alimentares também vem sendo investigadas.

Como já mencionado, as taxas de mortalidade no Brasil vêm diminuindo ao longo dos anos e também são comparáveis às taxas de outros países. Verificam-se valores mais elevados para as mulheres em relação aos homens, e um crescimento

a partir da faixa etária de 30 a 39 anos no período compreendido entre 1980 e 2001. Observa-se também que há uma grande variabilidade para as taxas de mortalidade ajustadas para a idade entre as localidades que apresentam Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) avaliadas. Os maiores valores no grupo dos homens são observados em Recife (0,68/100.000 habitantes), enquanto Goiânia apresentou a maior taxa de mortalidade ajustada por idade no grupo das mulheres (1,06/100.000 habitantes) (Coeli et al, 2005).

É de grande importância a inserção dos dados brasileiros de incidência e de mortalidade na epidemiologia mundial do câncer de tireóide, assim como a investigação de possíveis causas, permitindo comparações com outras nações e sugerindo ações estratégicas para o nosso país. Poucos estudos têm sido publicados sobre a epidemiologia do câncer de tireóide em relação à população brasileira. Grandes limitações nacionais existem, ao ponto de apenas os registros de São Paulo e de Goiânia preencherem os critérios mínimos para serem considerados de cobertura adequada para os casos de câncer (Coeli et al, 2005).

1.3 Fatores de risco para o desenvolvimento dos CPT

Os fatores de risco para o câncer de tireóide podem ser de natureza biológica, podem estar relacionados ao ambiente ou podem ter um caráter genético. A influência da ingestão de alimentos bociogênicos (couve, repolho, brócolis etc.) sobre o carcinoma diferenciado da tireóide é controversa, mas dados recentes mostram relação entre a incidência desses tumores e o índice de massa corporal (Renehan et al, 2008). Entre outros fatores que podem estar ligados a esta relação, estão várias citocinas relacionadas à resposta inflamatória induzida pela obesidade, o estresse oxidativo e as alterações imunológicas.

A radiação ionizante é o único fator reconhecidamente causador de carcinoma diferenciado da tireóide, mas é possível que a exposição à voltagem transitória e a outros fatores físicos também sejam carcinogênicas (Milham et al, 2008). A exposição à radiação em adultos (acima de vinte anos) também predispõe

ao câncer de tireóide, havendo um maior período de latência entre a exposição e o desenvolvimento do câncer, em relação ao período observado para as crianças e adolescentes. Porém, os riscos decorrentes da exposição de adultos ainda não estão bem estabelecidos (Zabel et al, 2006). O acidente ocorrido em Chernobyl, em 1986, provocou o aparecimento de CPT em mais de quatro mil crianças e adolescentes superexpostos à radiação. Nestes pacientes, o tempo mais curto decorrido entre a exposição e o diagnóstico foi de 4 anos, porém o risco de desenvolver a doença permanece elevado por 40 anos ou mais (Demidchik et al, 2007).

Outros exemplos onde observou-se o aumento da taxa de incidência do CPT em eventos de poluição ambiental com exposição da população à radiação de partículas nucleares, incluem os episódios das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki no Japão (1945) e nos testes nucleares realizados nas Ilhas Marshall (1954) e em Nevada nos Estados Unidos (1951-1962). Em regiões altamente contaminadas pelo acidente de Chernobyl, onde a exposição ao iodo radioativo corresponde principalmente ao isótopo I131, verificou-se com a duzentas vezes aumentada a taxa de incidência do carcinoma papilífero, principalmente em crianças (Huang et al, 2001); e constatou-se uma forte relação dose-resposta entre a dose de radiação recebida na infância e o risco de desenvolver câncer de tireóide (Tronko et al, 2006).

Ainda não está claramente elucidado se a maior incidência ocorre em crianças porque sua tireóide é mais susceptível aos danos causados pela radiação ou porque a exposição das crianças à radiação foi maior devido ao maior consumo do leite contaminado no evento radioativo ou ainda se ambas as hipóteses colaboram entre si (Tronko et al, 2006). Evidências experimentais *in vivo* e *in vitro* mostram que a radiação ionizante transforma principalmente folículos tireoideanos em crescimento, explicando a maior incidência do câncer de tireóide em crianças e jovens expostos à radiação, em relação à população adulta (Ward, 2005).

Em regiões com deficiência grave de iodo, foi demonstrado por vários artigos científicos que a sua suplementação pelo uso de sal iodado foi acompanhada, de um lado, por uma redução na prevalência do Carcinoma folicular da tireóide (CFT), de

outro, por um aumento estatisticamente significativo na prevalência do CPT (Ward et al, 2008).

O tratamento com iodo radioativo (^{131}I), utilizado no hipertireoidismo, não está claramente associado com o aumento da incidência do câncer de tireóide e, por outro lado, pode até mesmo erradicar pequenos carcinomas ocultos, considerando-se a alta dose de radiação liberada na glândula. Alguns estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar essa questão, mas os resultados têm se mostrado contrastantes entre as séries de casos analisados (Peixoto et al, 2003).

É interessante perceber que tanto a deficiência de iodo quanto a suplementação deste parecem modificar o risco oferecido pelo ^{131}I , o que pode ter importantes implicações de saúde pública. A suplementação estável em populações deficientes de iodo pode reduzir substancialmente o risco do câncer de tireóide relacionado ao iodo radioativo em caso de exposição a este após acidentes radioativos ou durante procedimentos terapêuticos ou de diagnóstico (Cardis et al, 2005).

Descendentes de pacientes portadores de CPT mostram aumento de incidência de 5 a 9 vezes, em relação ao restante da população (Hemminki et al, 2005). O CPT hereditário corresponde aproximadamente a 5% do total de casos, distribuídos em dois grupos de pacientes, aqueles que apresentam associação de CPT com neoplasias múltiplas e aqueles com pouco ou nenhum risco de desenvolver outras neoplasias.

A exposição da tireóide aos fatores etiológicos do CPT provoca instabilidade cromossômica, predispondo a célula folicular às mutações que constituem as alterações genéticas precoces ou eventos de iniciação. Posteriormente, sobrevêm as alterações genéticas tardias. A exposição à radiação ionizante na região da cabeça e pescoço, a história pessoal de bócio ou nódulos tireoideanos benignos, a história familiar de doença tireoideana, além de pertencer ao sexo feminino e estar em idade reprodutiva, são fatores identificados como positivamente associados ao câncer de tireóide, enquanto outros ainda estão sob investigação (Smalyte et al, 2006; Zabel et al, 2006).

A presença de bócio, que se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia da célula tireoideana, tem sido relatada como um fator de risco para o carcinoma papilífero, assim como a presença de nódulos tireoideanos (Hemminki et al, 2005).

A maioria dos cânceres de tireóide manifesta-se nos pacientes em idade reprodutiva, com 20-50 anos de idade, tendo sua incidência diminuída após a menopausa, e são cerca de três vezes mais frequentes em mulheres do que em homens (Ward, 2008).

1.4 Classificação Histológica dos CPT

Os tipos histológicos mais comuns dos carcinomas da tireóide incluem os carcinomas papilíferos, os foliculares, os indiferenciados (anaplásicos) e os medulares. Os tumores malignos bem-diferenciados da tireóide incluem o Carcinoma Folicular da Tireóide (CFT) e o Carcinoma Papilífero da Tireóide (CPT), além de suas variantes histológicas. Juntos, esses tumores representam mais de 95% dos tumores malignos da tireóide (Smalley et al, 2006). Manifestam-se, em sua maioria, em pacientes de 20-50 anos de idade e são de 2-4 vezes mais frequentes em mulheres. Os carcinomas bem-diferenciados da tireóide, em sua maioria, comportam-se de maneira indolente, apresentando crescimento e evolução lentos e excelente prognóstico. Sua taxa de sobrevivência para o período de 10 anos ultrapassa 90%, podendo ser efetivamente controlados por tratamento convencional de ressecção cirúrgica seguida ou não de ablação com iodo radioativo (Tang et al, 2010).

A manutenção de várias características morfológicas e de funções, que são normalmente encontradas na célula folicular é observada nos CPT, como a expressão de tireoglobulina e da proteína NIS (*sodium iodide symporter* - “proteína trocadora de iodeto e sódio”). A expressão normal dessa proteína transportadora de iodeto de sódio é que torna eficaz o tratamento ablativo de remanescentes tireoideanos e de metástases com I131, permitindo a remissão permanente na maioria dos pacientes e em quase 50% daqueles com metástases à distância.

Entretanto, em cerca de 30% dos pacientes ocorre desdiferenciação do tecido tumoral, ou seja, perda de funções e propriedades específicas da célula folicular, incluindo a perda da expressão adequada de proteínas (Huang et al, 2001, Ward et al, 2007). Nesse caso, o prognóstico piora bastante e os tumores passam a ser indiferenciados ou anaplásicos, com rápido crescimento, e tornam-se inacessíveis à terapia convencional em função da não captação de I131 (Graf, 2005).

Inicialmente, o diagnóstico histológico do CPT foi baseado apenas na presença do padrão clássico de arquitetura papilífera, com projeções papilares formadas de pedículos fibrovasculares recobertos por epitélio; mas atualmente considera-se principalmente alguns aspectos morfológicos nucleares característicos, que podem coexistir com estruturas foliculares e papilíferas. Dentre esses aspectos, pode-se citar o aumento do núcleo, irregularidades do contorno nuclear, com sulcos longitudinais, cromatina com aspecto hialino e a presença de pseudoinclusões (invaginações citoplasmáticas). Além dessas características nucleares, microscopicamente também é comum observar a presença de corpos psamomatosos (lâminas de material calcário que representam necrose de células tumorais com calcificação), infiltrado linfóide e fibrose (Adeniran et al, 2006).

Muitas variantes histológicas do CPT têm sido reconhecidas, cada uma com comportamento e padrões proliferativos próprios. Embora não apresentada a arquitetura papilífera clássica, mantêm os aspectos citológicos característicos do CPT. Algumas apresentam prognóstico mais agressivo em relação ao CPT clássico, enquanto outras possuem prognóstico melhor ou semelhante a este (Liska et al, 2005).

Os microcarcinomas papilíferos, também conhecidos como carcinomas ocultos, caracterizam-se por apresentar 1 cm ou menos de diâmetro. Frequentemente, são multifocais e costumam ser achados incidentalmente, sendo possível viver com esses carcinomas e morrer de outras causas, sem que se manifestem clinicamente. São considerados de baixa significância clínica, desde que não apresentem extensão extra-tireoideana, onde se faz necessário um tratamento mais agressivo (Pacini et al, 2006).

A variante folicular do CPT (CPTVF) é a mais frequente, depois do CPT clássico. Foi primeiramente descrita por Lindsay em 1953 (Basílio-de-Oliveira, 1990) e apresenta-se como um tumor composto predominantemente ou exclusivamente de folículos com células de aspecto nuclear característico do CPT. Em sua maioria, apresentam comportamento clínico similar ao CPT clássico, ou seja, com bom prognóstico. Pode-se dizer que o diagnóstico diferencial dessa variante não é difícil em relação às outras variantes do CPT; porém, o mesmo não se aplica em relação às outras neoplasias com padrão proliferativo folicular. Mais de 15% dos CPTVF podem apresentar invasão capsular e vascular, dificultando no diagnóstico diferencial do carcinoma folicular da tireóide (CFT), que também apresenta tais características. Já os CPTVF, que não apresentam invasão capsular e vascular, precisam ser diferenciados dos adenomas foliculares (Liska et al, 2005).

Outro fator que dificulta o diagnóstico dos CPTVF é o fato de co-existirem junto com o bócio multinodular, fazendo com que muitas vezes sejam confundidos com nódulos adenomatóides. A observação cuidadosa das características nucleares próprias do CPT é a única maneira segura de fazer esses diagnósticos diferenciais, em termos histológicos. Porém, em alguns casos os aspectos nucleares encontram-se apenas focalmente distribuídos no tumor, tornando o diagnóstico controverso, podendo ser considerados desde microfocos de CPT crescendo em um nódulo benigno até um nódulo maligno de CPTVF (Baloch et al, 2007).

Embora o CPTVF normalmente se apresente encapsulado, pode ocorrer também como uma rara variante, a variante folicular difusa. Esta variante difusa não-encapsulada ocorre principalmente em mulheres jovens e acomete toda a tireóide. Está associada com invasão vascular, extensão extratireoideana e metástase à distância, principalmente para ossos e pulmão (Baloch et al, 2007). A variante de células altas representa cerca de 5-10% dos casos de CPT. É composta de células com altura maior que o dobro da largura em mais de 30% do tumor. Esses tumores costumam ser maiores ao diagnóstico e, sobretudo em pacientes com mais de 50 anos, apresentam mais facilmente invasão extra-tireoideana e invasão vascular do que o CPT clássico, assim como metástases à distância para ossos e pulmão, apresentando também maior taxa de mortalidade (Basolo et al, 2002).

A variante encapsulada do CPT possui cápsula fibrosa bem demarcada que separa o tumor do tecido normal adjacente. É comum ocorrer a infiltração capsular, mas não se observa invasão vascular. Macroscopicamente se assemelha a um adenoma folicular, porém ao microscópio observam-se as características histocitológicas típicas do CPT, além dos corpos psamomatosos. Dentre as variantes consideradas mais agressivas inclui-se a variante esclerosante difusa. Essa é uma variante rara, representando apenas cerca de 1,8% dos casos de CPT, preponderante em pacientes mais jovens do sexo feminino, com comprometimento difuso de um ou ambos os lobos da tireóide através de disseminação linfática intraglandular. Tem morfologia característica e observa-se o exagero dos diferentes componentes estruturais do CPT, além de apresentar infiltração linfóide, fibrose extensa e muitos corpos psamomatosos. A incidência significativa de metástases em linfonodos regionais e pulmonares demonstra grande capacidade de disseminação dessa variante, exigindo conduta terapêutica mais agressiva (Sheu et al, 2007).

1.5 Fatores Prognósticos para o CPT

Vários autores buscam identificar fatores de prognóstico que possam dividir os pacientes com carcinomas diferenciados da tireóide em indivíduos de baixo-risco e de alto-risco, na tentativa de otimizar a abordagem cirúrgica e o seguimento destes pacientes. Aliada aos fatores de risco, principalmente a idade do paciente e as características anatomopatológicas do tumor, foi elaborada uma série de sistemas de estadiamento e classificações. Exemplos de tais classificações e de seu impacto na conduta cirúrgica incluem o AGES (Age, Grade, Extracapsular spread, and Size) e o AMES (Age, Metastasis, Extracapsular tumor, and Size), sistemas de estadiamento baseados, principalmente, na idade do paciente e nas características anatomopatológicas (Hadjieva, 2001).

Dados do programa de vigilância epidemiológica norte-americana (*Surveillance Epidemiology and End Results program – SEER*) e da base norte-americana de dados em câncer (*National Cancer Data Base – NCDB*) ilustram a importância da idade sobre os índices de sobrevivência, mostrando sobrevivências de 95% a 100% em cinco anos para pacientes abaixo dos 45 anos de idade, em estadios I-II

(Hundahl et al, 2000). Pacientes com menos de 20 anos de idade têm 99% de sobrevida em 10 anos, em contraste com os pacientes com mais de 70 anos, que possuem 86% e 70% de chance de estarem vivos, para os CPT e CFT, respectivamente. O NCDB mostra que a influência da idade é ainda mais importante para os pacientes de 60 a 69 anos de idade, com queda de sobrevida para 65% e 57% em 10 anos para o CPT e CFT, respectivamente (Hundahl et al, 2000). Dados brasileiros corroboram que a idade é fator preditivo importante de prognóstico (Ward et al, 2004). Com relação ao gênero, os homens têm metade da frequência de carcinomas diferenciados da tireóide em relação às mulheres, porém, o dobro do risco de morrer por ele (Mazzaferri et al, 2001).

O impacto do acometimento ganglionar na evolução dos pacientes com CDT ainda é controverso na literatura. Investigar e retirar todos os gânglios suspeitos de infiltração tumoral, seguramente não afeta os resultados, que mostram que o envolvimento ganglionar não influi no prognóstico dos pacientes (Souza et al, 2004). Entretanto, a dissecação compartimental central bilateral ou a dissecação radical lateral modificada do pescoço são recomendadas sempre que existe envolvimento nodal de pacientes de alto risco (NCCN - *Thyroid carcinoma practice guidelines*). Linfonodos cervicais, são os locais mais frequentes de metástases do CPT e são encontrados em 50% a 80% dos casos, sobretudo no compartimento central (paratraqueal) (Wada et al, 2003). É prática comum entre os cirurgiões retirar linfonodos suspeitos de acometimento tumoral, mesmo em pacientes com moderado ou baixo risco. Entretanto, o impacto que tal remoção tem no tempo livre de doença e na sobrevida destes pacientes é controverso (Ohshima et al, 2002). Grandes séries mostram que o acometimento nodal, especialmente quando bilateral e envolvendo o mediastino, é um fator independente de recorrência e a dissecação sistemática de linfonodos melhora significativamente os índices de recorrência e sobrevida em pacientes com tumores T1-T3, embora tal conclusão possa não ser aplicável a pacientes de moderado ou baixo risco, nem haja consenso quanto a sua utilidade em termos de diminuição de mortalidade, (Ohshima et al, 2002).

Por outro lado, a literatura é unânime em relação ao mau prognóstico de pacientes com metástases à distância, que aparecem em 5% a 23% das grandes séries (Hundahl et al, 2000; Ronga et al, 2002; Chow et al, 2002; Ward et al, 2004;

Mazzaferri et al, 2001; Welker et al, 2003; Boone et al, 2003; Kinder et al, 2003; Cohen et al, 2003; Schlumberger et al, 2004).

Metástases pulmonares causando insuficiência respiratória, hemorragia maciça e obstrução das vias aéreas pelo crescimento tumoral, juntamente com colapso circulatório decorrente de compressão de veia cava por metástases mediastinais ou esternais, são as causas imediatas de mortes mais frequentemente relatadas no CPT (Ronga et al, 2002). É importante salientar que a mortalidade relacionada às metástases sofre influência da idade mais avançada, da presença de sintomas decorrentes das metástases, de sua localização e do seu tratamento com radioiodo (Hundahl et al, 2000; Ronga et al, 2002; Kinder et al, 2003).

Mesmo os pacientes com metástases ao diagnóstico ou que desenvolvem metástases após a cirurgia têm uma sobrevida relativamente longa, em torno de quatro anos, com cerca de um quarto dos pacientes vivos em 10 anos. Isto é particularmente mais evidente em crianças e adultos jovens (La Quaglia et al, 2000). Na verdade, é difícil avaliar o impacto de todos os fatores clínicos e patológicos que, reconhecidamente, influem na sobrevida livre de doença (como sexo, tamanho e extensão do tumor, tipo histológico) por causa do diagnóstico precoce e excelente sobrevida da maior parte dos pacientes com CDT (Mazzaferri et al, 2001).

1.6 Patologia Molecular do CPT

O câncer é uma doença complexa, na qual as células conseguem controlar/desviar os controles normais de proliferação e sobrevivência celular por meio da aquisição de uma série de atributos biológicos que lhes permitem multiplicar autonomamente e disseminar como metástases para todo o organismo. Esses atributos são adquiridos a partir de alterações no genoma, representadas por mutações que envolvem de um lado ganho de função para os proto-oncogenes, genes responsáveis por proteínas que ativam o ciclo celular e, de outro, perda de função para os genes supressores de tumor, responsáveis pela inibição do ciclo celular (Hwang et al, 2001).

Os tumores derivados do epitélio folicular da tireóide representam um modelo interessante e singular de estudo para a compreensão da patogênese molecular do câncer, porque englobam um largo espectro de fenótipos com taxas de crescimento, diferenciação e agressividade variáveis, apesar de serem originados de um único tipo celular. Alguns fatores ambientais, como a deficiência de iodo e as radiações ionizantes parecem influenciar também nos aspectos genotípicos e fenotípicos do câncer de tireóide, ou seja, a exposição a esses fatores ambientais correlacionam com alterações genéticas e variantes histológicas tumorais específicas (Nikiforov et al, 2011).

A instabilidade genômica induzida pela exposição aos diversos fatores de risco pode resultar em eventos iniciais de transformação maligna da célula folicular, que envolvem principalmente proto-oncogenes da via de sinalização de proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPK), incluindo receptores e efetores dessa via (RET, RAS, BRAF). Rearranjos do gene do receptor de tirosina-quinase RET são caracteristicamente observados no CPT e suas variantes, enquanto mutações somáticas ou germinativas nesse gene são encontradas no carcinoma das células C da tireóide, o carcinoma medular. Alterações no gene da proteína-quinase BRAF são caracteristicamente encontradas no CPT, enquanto mutações no gene da proteína-quinase RAS são mais comuns em lesões com arquitetura folicular, incluindo o CFT e a variante folicular do CPT. Entretanto, é discutida a importância da presença dessas mutações em tumores benignos como evento inicial na tumorigênese da tireóide e também sua implicação na progressão tumoral, por ocorrerem também em carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados da tireóide (Giusti et al, 2010, Nikiforov et al, 2011).

A iniciação e a progressão do câncer de tireóide envolvem múltiplas alterações genéticas e epigenéticas, levando à mutações por meio da ativação das vias de sinalização MAPK e PI3K-AKT. Como já mencionado, alterações genéticas comuns encontradas no CPT incluem mutações pontuais nos genes *BRAF* (40-45%), *RAS* (10-20%), assim como rearranjos cromossômicos RET/PTC (10-20%), sendo os mais comuns RET/PTC1 e RET/PTC3 (Figura 1). Análises de mutações em *BRAF* e dos rearranjos RET/PTC têm se mostrado importantes ferramentas no diagnóstico das neoplasias tireoideanas (Nikiforova et al, 2009).

Nos carcinomas bem-diferenciados da tireóide, alterações nos genes *BRAF*, *RET* e *RAS* são encontradas em aproximadamente 70% dos casos, raramente ocorrendo simultaneamente no mesmo tumor (Stanojevic, et al 2011). Os mecanismos de mutação parecem estar ligados a fatores etiológicos específicos, enquanto os rearranjos cromossômicos têm uma forte associação com a exposição à radiação ionizante e, possivelmente, com a fragilidade do DNA, enquanto que mutações pontuais, provavelmente surgem como resultado de mutagênese química (Nikiforov et al, 2011).

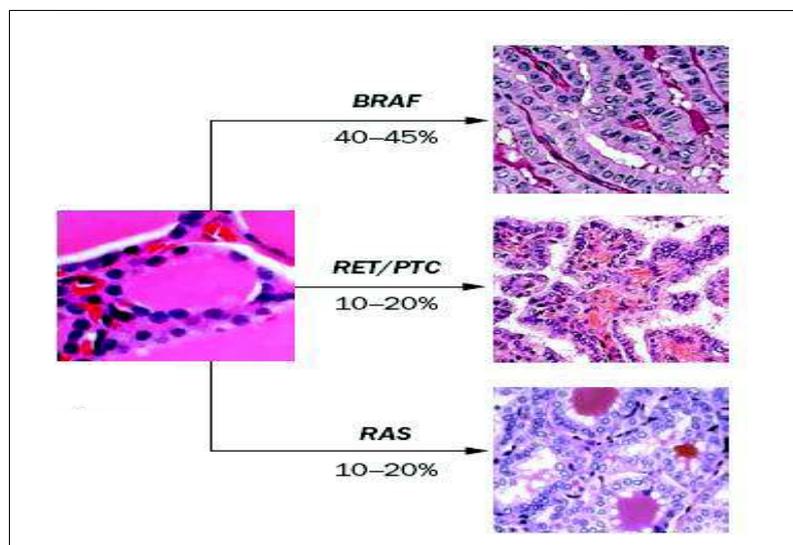


FIGURA 1. Alterações moleculares no CPT. Adaptado de Expert Reviews of Molecular Diagnostics 8 (1), 83–89 (2008).

1.7 O Gene *BRAF*

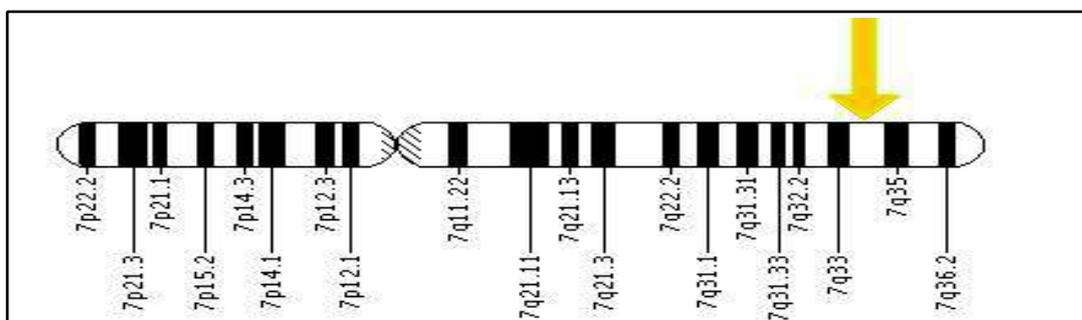


FIGURA 2. Representação esquemática mostrando a localização do gene *BRAF* no cromossomo 7. Fonte: Genetics Home Reference-site: ghr.nlm.nih.gov.

O gene *BRAF* (7q34), cujo nome oficial é homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino v-raf, codifica a proteína RAF tipo B. O gene *BRAF* está localizado no braço (q) longo do cromossomo 7 na posição 34 (Figura 2). É composto por 17 íntrons e 18 exons abrangendo uma região de 190.284 pb (Figura 3).

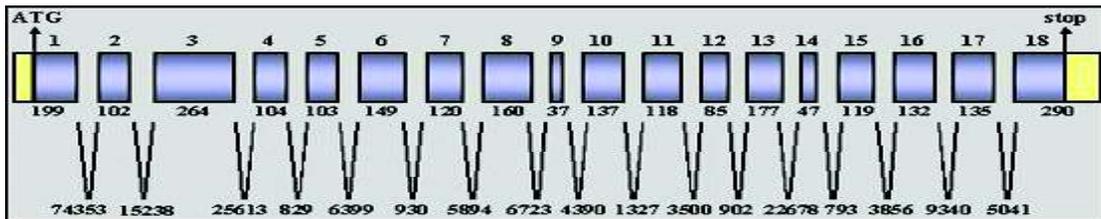


FIGURA 3. Representação esquemática do gene *BRAF* com os seus 18 éxons e 17 íntrons. Fonte: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*- site:jlhuret@AtlasGenetics Oncology.org

1.8 A Proteína BRAF

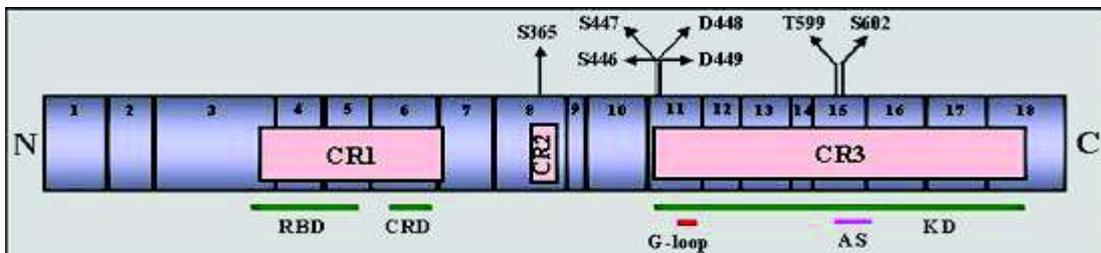


FIGURA 4. Proteína BRAF. Os números dentro das caixas azuis indicam o exon a partir do qual é traduzida cada parte da proteína. As três caixas rosas representam as regiões conservadas da proteína (CR1, CR2 e CR3). As barras verdes representam três domínios distintos: RBD (domínio de ligação RAS), CRD (domínio rico em Cisteína) e KD (domínio 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@AtlasGenetics Oncology.org)

A proteína BRAF (Figura 3) apresenta 766 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 84.436 daltons, com localização no citoplasma celular. Esta proteína pertence à família RAF de serina/treonina-quinases, que são enzimas 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 e 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).

A proteína RAF ativada fosforila e ativa a proteína MEK (MAPK/ERK quinase) em dois resíduos de serina no domínio-quinase. A MEK quinase ativada fosforila e ativa ERK (quinase regulada por sinal extracelular). A proteína ERK ativada tem muitos substratos no citoplasma, mas pode migrar para o núcleo controlando a expressão de genes através da ativação de vários fatores de transcrição que estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular, como C-MYC e ELK1 (Kolch et al, 2002; Maciel et al, 2005).

As proteínas RAF possuem uma estrutura comum, consistindo de um domínio regulatório N-terminal e um domínio quinase C-terminal. No domínio regulatório, encontram-se duas regiões homólogas conservadas, onde estão os sítios de ligação à proteína RAS e o domínio rico em cisteína (CR1), além do domínio rico em serina e treonina (CR2). No domínio de quinase encontra-se o segmento de ativação (CR3), requerido para a atividade da proteína RAF.

1.9 Via Intracelular da MAPK

Como já foi mencionado, BRAF é um dos três membros da família RAF de serina/treonina kinases (ARAF, BRAF e CRAF), cujos produtos proteicos são efetores da via MAPK: RAF-MEK-ERK (Figura 5). Essa via é crítica na transdução de sinais iniciada pelos fatores de crescimento, por hormônios e citocinas, estando, portanto, envolvida na regulação da proliferação celular (Trovisco et al, 2007). Mutações em *BRAF* facilitam a instabilidade genômica, aumentam o poder de invasão e, por fim, intensificam a desdiferenciação tumoral, além de suprimir mais significativamente a apoptose (Puxeddu et al, 2007).

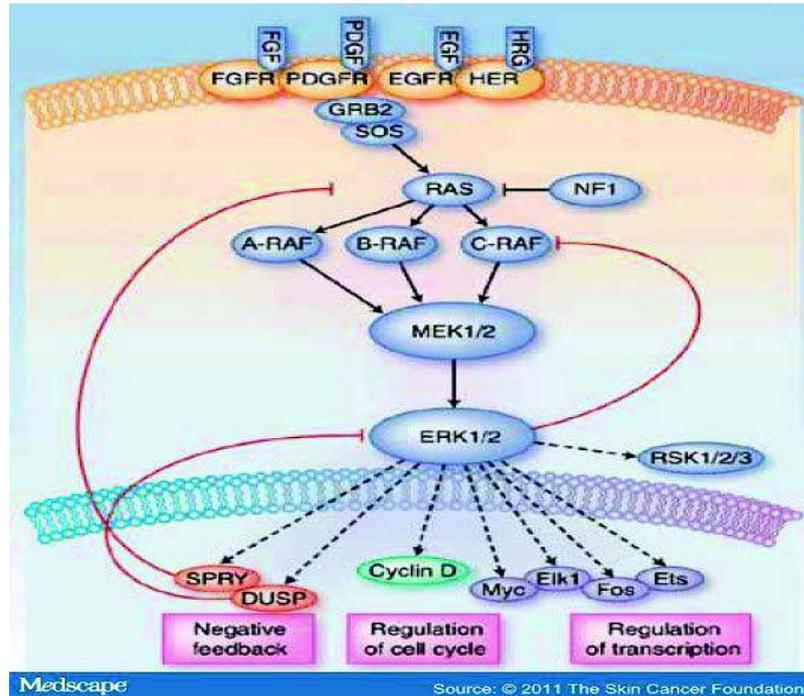


FIGURA 5. Via Intracelular da MAPK. BRAF (RAF cinase do tipo B) é a isoforma mais abundante e potente da família RAF nas células foliculares da tireóide. BRAF ativada fosforila e ativa duas MEKs (MEK1 e MEK2) e estas por sua vez fosforilam as duas ERKs subsequentes. As ERKs 1 e 2 ou MAP cinases fosforilam proteínas, causando várias alterações na expressão de vários genes, envolvidos na proliferação, apoptose e carcinogênese. Fonte: Medscape. The Skin Cancer Foundation, 2011

A via de sinalização RAS–RAF–MEK–ERK é considerada uma via altamente conservada em eucariotos (Melillo et al, 2005). Vários proto-oncogenes fazem parte dessa via, que pode ser estimulada por praticamente todos os fatores de crescimento clássicos e está hiperativa em 30% de todos os tumores humanos, incluindo os do cólon e pulmão. Essa hiperatividade tem sido associada a praticamente todos os processos funcionais próprios das células cancerosas, imortalização, proliferação independente de fator de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, habilidade de invasão e metástase, angiogênese, evasão da apoptose e até mesmo a resposta alterada a quimioterápicos. O potencial dessa via na influência sobre esses aspectos da célula cancerosa, entretanto, pode variar, dependendo do tipo de célula ou de tumor, assim como de outras alterações genéticas e do microambiente do tumor (Kolch et al, 2002).

A proteína RAF é recrutada do citoplasma para o sistema de membranas celulares, onde é ativada em múltiplos passos, que envolvem a defosforilação de

sítios inibitórios (que mantêm a proteína no estado inativo) pela fosfatase 2A (PP2A), assim como a fosforilação de sítios ativadores pelas quinases PAK3, quinases da família Src e outras ainda não conhecidas. O que se tem é uma cooperação entre esses agentes envolvidos na ativação da proteína RAF, para ajustar o nível de ativação apropriado ao estímulo recebido. A proteína RAF ativada fosforila e ativa a proteína MEK (MAPK/ERK quinase) em 2 resíduos de serina no domínio-quinase, e a MEK quinase ativada fosforila e ativa ERK (quinase regulada por sinal extracelular). A proteína ERK ativada tem muitos substratos no citoplasma, mas pode migrar para o núcleo controlando a expressão de genes através da ativação de vários fatores de transcrição que estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular, como C-MYC e ELK1 (Kolch et al, 2002, Maciel et al, 2005, Tang et al, 2010).

1.10 Mutação V600E de *BRAF*

A mutação V600E é a mutação mais comumente encontrada no CPT (em média de 45%). Trata-se de uma mutação pontual do tipo missense em que ocorre a transversão da base nitrogenada timina para adenina na posição 1799 (T1799A), levando à substituição do aminoácido valina pelo ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína (mutação V600E) e representa 90% das mutações observadas no exon 15 (Figura 6). Essa mutação provoca ativação constitutiva da BRAF quinase, ao simular sua fosforilação no segmento de ativação quando um aminoácido neutro (valina) é substituído por um aminoácido carregado negativamente em posição adjacente a um sítio de fosforilação de serina. Esta substituição causa a ruptura de interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos no local exato de ligação do ATP que mantinha a conformação inativa (Xing 2005).

A mutação V600E no gene *BRAF* leva à ativação constitutiva da proteína BRAF quinase da via MAPK. Estudos recentes estabeleceram a mutação V600E como um marcador de agressividade da doença, recorrência e mau prognóstico nos tumores. Outras mutações no gene *BRAF* foram descritas nas posições 598, 599 e 601, mas essas mutações são muito raras em CPT em comparação com a mutação V600 E . Muitas pesquisas estão sendo realizadas no sentido de desenvolver uma

terapia alvo dirigida para tumores com positividade para a mutação V600E, principalmente onde a terapia convencional não fornece resposta satisfatória (Asuragen, 2011).

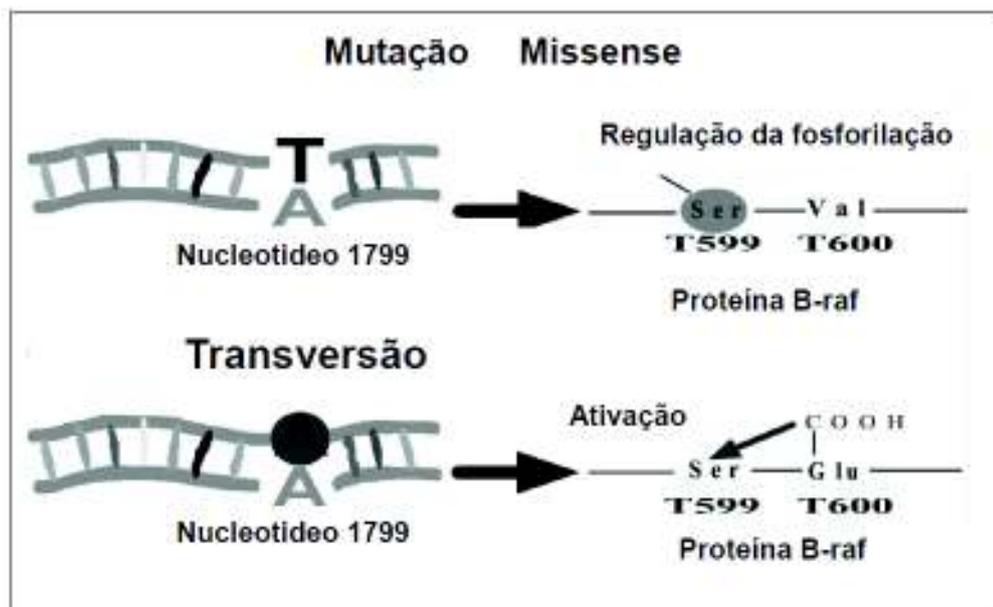


FIGURA 6. Mecanismo molecular da mutação V600E do gene *BRAF*. Modificado de Wojciechowska et al, 2006.

As mutações pontuais no exon 15 do gene *BRAF* foram recentemente consideradas como as alterações genéticas mais comuns no CPT, enquanto mutações no exon 11 desse gene não foram encontradas no câncer de tireóide, diferentemente de outros tipos de câncer (Xing 2005). Cerca de 30 artigos publicados na literatura nos últimos anos, referentes a pacientes adultos, com diversidade geográfica, étnica e dos subtipos histológicos dos tumores, evidenciaram a presença da mutação V 600E em CPT(em torno de 50%). Alguns destes trabalhos encontram-se descritos nas tabelas 1 e 2, a seguir. A mutação V600E de *BRAF* é também encontrada no carcinoma anaplásico derivado de variantes agressivas do CPT. No entanto, a mutação é rara na variante folicular do CPT e não é encontrada no CFT (Tang et al, 2010).

No CPT, a mutação V600E no gene *BRAF* está associada à maior ocorrência de metástases à distância, aparência papilífera característica, estágios mais

avançados da doença e idade mais avançada dos pacientes. Por outro lado, a mutação não é comum em CPT não-esporádico, relacionado a exposição à radiação. A frequência dessas mutações em carcinoma anaplásico da tireóide (CAT) coexistindo com CPT é significativamente maior (60–78%) que em CAT sem o componente papilífero (0–4%), o que sugere uma maior tendência à dediferenciação para casos de CPT com essa mutação (Xing 2005; Giusti et al, 2010).

Em microcarcinomas papilíferos, tem sido relatada a ocorrência da mutação V600E, nos estágios iniciais do desenvolvimento do tumor. Esses tumores parecem apresentar uma prevalência variável na dependência do subtipo histológico, ocorrendo com maior frequência na agressiva variante de células altas e com menor frequência na variante folicular (Basolo et al, 2010). Outras mutações mais raras em *BRAF* também têm sido relatadas nos carcinomas da tireóide, como a mutação K601E e também a fusão dos genes *BRAF* e *AKAP9* por inversão paracêntrica do braço longo do cromossomo 7, gerando o oncogene quimérico *AKAP9/BRAF*, que parece estar associado ao CPT induzido por radiação ionizante (NiKiforova et al, 2009, NiKiforov et al, 2011).

1.11 Revisão de artigos científicos que demonstraram associações entre a mutação V600E de *BRAF* e metástase nos CPT

TABELA 1. Revisão de artigos científicos que demonstraram associações entre a mutação V600E de *BRAF* e metástase nos CPT

Estudo	Metodologia	Casuística	Associação com Metástase	p
NAMBA et al, (2003)	PCR	126 casos	sim	0.0330
Kim KH et al, (2004)	PCR	70 casos	sim	0,0480
Xing et al, (2005)	PCR e sequenciamento direto do DNA	219 casos	sim	0,0010
Kim J et al, (2006)	PCR quantitativo em tempo real	103 casos	sim	0,0001
Kebebew et al, (2007)	PCR e sequenciamento direto do DNA	245 casos	sim	0.0323
Nakayama et al, (2007)	PCR e sequenciamento direto do DNA	40 casos	sim	0.0440
Lupi et al, (2007)	PCR- SSCP sequenciamento direto do DNA	500 casos	sim	0.0009
Frasca et al, (2008)	RT-PCR	323 casos	sim	0.0001
Xing et al, (2009)	PCR e kit Mutector	190 casos	sim	0,0020
Basolo et al, (2010)	PCR- SSCP sequenciamento direto do DNA	1060 casos	sim	0,0001

1.12 Revisão de artigos científicos que não demonstraram associações entre a Mutação V600E de *BRAF* e metástase nos CPT

TABELA 2. Revisão de artigos científicos que não demonstraram associações entre a Mutação V600E de *BRAF* e metástase nos CPT

Estudo	Metodologia	Casuística	Associação com Metástase	<i>p</i>
Riesco-Eizaguirre et al, (2006)	PCR-SSCP e sequenciamento direto do DNA	67 casos	Não	0,4200
Durante <i>et al.</i> , (2007)	RT-PCR e sequenciamento direto do DNA	93 casos	Não	0,7300
kwak et al, (2009)	PCR e sequenciamento direto do DNA	339 casos	Não	0,5650
Hwang et al, (2010)	PCR e sequenciamento direto do DNA	135 casos	Não	0,0904
Lee JH et al, (2010)	PCR , sequenciamento direto do DNA e pirosequenciamento	52 casos	Não	0,1600

1.13 Significado Clínico da Mutação V600E

O manejo de pacientes com câncer de tireóide depende do subtipo histológico e do estágio do tumor. Entre os cânceres da tireóide, uma grande maioria dos pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide (CDT) pode ser curada com o regime terapêutico convencional composto de cirurgia, iodo radioativo e terapia hormonal. Menos de 10% dos pacientes que se apresentam com CDT irão desenvolver metástases à distância (Durante et al, 2006; Lee J et al, 2010).

Em indivíduos resistentes ao iodo radioativo, a quimioterapia convencional não fornece resultados satisfatórios e nos últimos anos, o uso de inibidores da tirosina quinase em ensaios clínicos de pacientes com câncer de tireóide têm

mostrado resultados promissores. Considerando o BRAF um dos membros da família RAF de serina /treonina Kinases que são efetores da via MAPK, uma via de sinalização importante na patogênese dos cânceres da tireóide, a escolha destes inibidores parece ser uma opção racional no tratamento (Huyck et al, 2011).

O Sorafenib (Nexavar) foi o primeiro inibidor da RAF quinase usado em testes clínicos e agora está aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso no carcinoma de células renais e carcinoma hepatocelular. Embora o sorafenib tenha sido desenvolvido inicialmente como um inibidor de RAF, não apresenta potência e seletividade suficientes para RAF quinases (Wilhelm et al, 2004). A experiência com este agente sugere que seu principal mecanismo de ação no câncer renal é o potencial anti-angiogênico e que a inibição da RAF contribui pouco para sua eficácia clínica nesta doença (Eisen et al, 2006; Flaherty 2007).

Houve então o desenvolvimento de uma segunda geração de inibidores da RAF, com maior seletividade para BRAF mutante e maior potência *in vivo*. O PLX4032/ RG7204 (Plexxikon/Roche), que é um inibidor seletivo de RAF, foi testado em ensaio *in vitro* e inibe a RAF quinase e as três iso-formas RAF em concentrações nanomolares (Tsai et al, 2008; Yang et al, 2010). Em células com mutações BRAF V600E, PLX4032 demonstra uma inibição potente da sinalização de BRAF, parada do ciclo celular e, em alguns casos, morte celular (Joseph et al, 2010).

A observação pré-clínica de que PLX4032 inibe a ativação da via MAPK quinase apenas nas células tumorais e não nas células normais, sugeriu que este agente pode apresentar um amplo índice terapêutico no tratamento dos pacientes com mutação V600E (Hatzivassiliou et al, 2010; Heidorn et al, 2010). Em um recente ensaio clínico de fase 1 com PLX4032, altos níveis séricos da droga foram tolerados (>50 mM), com toxicidade mínima (Flaherty et al, 2010).

Atividade clínica promissora também foi relatada recentemente com um segundo inibidor seletivo da RAF, GSK2118436 (Kefford et al, 2010). Em um ensaio clínico de fase 1 com GSK2118436, houve uma taxa de 63% de resposta observada em um grupo de pacientes com melanoma e mutação BRAF V600E. GSK2118436 e PLX4032 possuem várias diferenças farmacológicas e podem ter impacto em suas eficácias a longo prazo, assim como nos perfis de toxicidade (Bollag et al, 2010).

GSK2118436 é aproximadamente 80 vezes mais potente que o PLX4032, tendo como alvo o alelo mutante BRAF V600E, mas apresenta uma meia-vida inferior (~ 4-9 versus 40-50 h) (Bollag et al, 2010; Kefford et al, 2010). Embora com bons resultados preliminares, vale ressaltar que pacientes cujos tumores expressam alelos V660K e V600G, respondem ao tratamento com GSK2118436, enquanto pacientes cujos tumores abrigam o alelo K601E não respondem satisfatoriamente à droga (Kefford et al, 2010).

Em uma recente atualização do estudo de fase II com sorafenib, foi verificada uma correlação entre maior sobrevida livre de doença e presença de mutação V600E. Especificamente, para pacientes com CPT, a sobrevida livre para aqueles pacientes com o tipo selvagem de *BRAF* foi de 54 semanas em comparação com 84 semanas a mais de sobrevida para pacientes com mutação V600E ($p = 0,028$). Assim, é provável que no futuro, o uso de inibidores de tirosina quinase em pacientes com cânceres da tireóide poderão vir junto com análises moleculares, para assim garantir melhor a resposta ao tratamento (Brose et al, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar as possíveis associações entre a mutação V600E do gene *BRAF* e a detecção imuno-histoquímica da proteína BRAF em carcinomas papilíferos de tireóide tratados no Hospital Araújo Jorge (HAJ), em Goiânia-GO.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar os aspectos clínicos e histopatológicos de 116 casos de carcinomas papilíferos de tireóide tratados no HAJ.
- 2) Avaliar a detecção imuno-histoquímica da proteína BRAF em 116 casos de carcinomas papilíferos de tireóide.
- 3) Avaliar a mutação V600E do gene *BRAF* em 116 casos de carcinomas papilíferos de tireóide.
- 4) Avaliar as possíveis associações entre os níveis de expressão da proteína BRAF e os aspectos clínicos e histopatológicos dos tumores.
- 5) Avaliar as possíveis associações entre a mutação V600E do gene *BRAF* e os aspectos clínicos e histopatológicos dos tumores.
- 6) Avaliar as possíveis associações entre os níveis de expressão da proteína BRAF e a presença da mutação V600E do gene *BRAF* em 116 casos de carcinomas papilíferos de tireóide tratados no HAJ.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi avaliado e recomendado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge, conforme Parecer no. 049/2010 (Anexo 1). Somente após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, 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.

3.2 Seleção de casos de carcinoma papilífero de tireóide

Os casos de carcinomas papilíferos de tireóide metastáticos e não metastáticos foram selecionados a partir dos livros de registro do Setor de Anatomia Patológica (SAP) do HAJ, no período de 2000 a 2005. 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 (OMS, 2004). Os pacientes incluídos no estudo apresentavam diagnóstico histopatológico comprovado de carcinoma 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.

Pacientes com diagnóstico de carcinoma papilífero de tireóide, sem comprovação histopatológica, cujo bloco não se encontrava no SAP do HAJ, ou que não apresentavam os dados clínicos e histopatológicos descritos foram excluídos do estudo. Os dados clinicopatológicos foram colhidos a partir dos respectivos

prontuários e utilizados para a confecção de um banco de dados. Os 64 casos de carcinomas papilíferos não metastáticos foram selecionados nos dois primeiros anos do estudo (2000-2001), enquanto os casos metastáticos foram selecionados ao longo de um período de cinco anos (2000-2005). Os espécimes biológicos analisados neste estudo consistiram de fragmentos de carcinoma papilífero da tireóide, colhidos por meio de cirurgia, antes de qualquer abordagem radioterápica ou quimioterápica.

3.3 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é um método de análise molecular dos tecidos, baseado na detecção microscópica de proteínas teciduais. O mecanismo básico da imuno-histoquímica consiste no reconhecimento do antígeno a ser pesquisado por meio um anticorpo específico, associado aos diversos tipos de processos de visualização. O anticorpo reconhece apenas um único antígeno que pode ser o produto protéico da célula neoplásica.

A técnica usual utiliza um anticorpo secundário, que se liga ao anticorpo primário e é associado a um complexo de visualização (polímero com amplificação). O cromógeno DAB (diaminobenzidina) confere cor marrom ao precipitado permanente. Logo, as áreas positivas coram-se de marrom e as negativas, com o corante utilizado para a contra-coloração, a hematoxilina (azul), (DABBS D Diagnostic Immunohistochemistry 2006).

Os fragmentos de tumores analisados neste estudo foram fixados em formol 10% tamponado e incluídos em blocos de parafina. Após a confirmação do diagnóstico, foram confeccionadas lâminas para o estudo imuno-histoquímico. A espessura dos cortes para análise imuno-histoquímica era de três micrômetros. A análise imuno-histoquímica empregou o método da imunoperoxidase associada a polímeros (Kit MACH 4 Biocare Medical, CA, USA) e foi utilizada para a detecção de antígenos teciduais por meio do anticorpo BRAF (clone F-7), Santa Cruz Biotechnology Inc.

Os cortes montados em lâminas silanizadas foram desparafinizados com o uso de xilol e hidratados em uma bateria de etanol, com concentrações decrescentes até 50%, e água destilada. Os antígenos tissulares foram recuperados por calor úmido e pressão em solução de tampão citrato 10mM/pH 6,0. A atividade da peroxidase tissular endógena foi extinta por tratamento com solução de H₂O₂ 3% por 15 minutos. Após, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS), pH 7.4 por cinco minutos. Em seguida, foi aplicada uma camada delgada de bloqueador de proteínas inespecíficas (Background Sniper, Biocare Medical, CA, USA).

As lâminas foram incubadas, posteriormente, a 4°C, overnight, com o anticorpo diluído em solução de PBS pH 7,4 contendo 1% de albumina sérica bovina. Após incubação com anticorpo primário, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS pH 7.4, por cinco minutos, e incubadas durante 30 minutos com a sonda (Kit MACH 4 Biocare Medical, CA, USA). Novamente as lâminas foram lavadas com PBS 7,4 e incubadas com o complexo de polímeros e peroxidase por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS pH 7,4 por cinco minutos, as lâminas foram reveladas com o cromógeno diaminobenzidina. Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra coradas com hematoxilina.

Os cortes foram desidratados em álcool absoluto por cinco vezes, dois minutos em cada etapa, e depois tratados em xilol por três vezes. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas em resina do tipo Entellan (Merck KgaA). A análise da detecção da proteína BRAF foi feita pela contagem das células tumorais com marcação citoplasmática, nas áreas tumorais de maior marcação. A percentagem de células tumorais positivas para a marcação de BRAF foi realizada em campos microscópicos de 3 a 5 mm, com aumento de 400 X, sob microscopia de luz.

A contagem, sempre que possível era feita em três campos e somente a marcação citoplasmática difusa das células tumorais foi considerada. A marcação de células estromais e inflamatórias não foi considerada nesta avaliação. As amostras foram divididas em dois grupos de marcação para BRAF, ou seja, < 50% e ≥ 50%, de acordo com os valores de cutoff estabelecidos por meio de uma curva ROC (Receiver Operating Characteristic), definida com base na marcação imuno-histoquímica de BRAF e a presença de mutação V600E do gene BRAF.

3.4 Extração de DNA das amostras de carcinomas 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 a 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.

3.4.1 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.

3.4.2 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.

3.4.3 Precipitação de proteínas

Após a lise celular, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionados 40 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.

3.4.4 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.

3.4.5 Hidratação do DNA

Os pellets correspondentes a cada amostra foram ressuspensos em 20 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.

3.5 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 3) 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 3. 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)	94°C - 3 min
5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGG-3'	94°C - 30 seg
Primer P2 (f)	60°C - 1 min
5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'	72°C - 1 min
	72°C - 10 min
	4°C - Infinito

} 38 ciclos

3.6 Análise Estatística

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.

4. RESULTADOS

4.1 Grupo de Estudo

Neste estudo, 116 pacientes com carcinoma papilífero da tireóide foram estudados, dos quais 88 (76%) eram mulheres e 28 (24%) eram homens. A idade dos pacientes variou de 13 a 83 anos (média 36,8). O tamanho do tumor variou entre 0,4 cm e 8,5 cm (média 2,6 cm). Com relação à presença de metástases linfonodais, 52 casos (45%) eram metastáticos. Quatro casos apresentaram metástases à distância, sendo dois deles nos ossos, um no sistema nervoso central e o outro no crânio e pulmões. Dentre os casos estudados, o crescimento tumoral com extensão extra-tireoidiana foi observado em 70 casos (60%).

4.2 Análise imuno-histoquímica da expressão de BRAF nos carcinomas papilíferos de tireóide

Dentre os carcinomas papilíferos de tireóide avaliados, 30 casos (26%) foram negativos para a detecção imuno-histoquímica da proteína BRAF (Figura 7) e 86 casos (74%) foram positivos para a detecção de BRAF (Figura 8, 9 e 10). As amostras foram divididas em dois grupos de marcação para BRAF, ou seja, aquelas com marcação em menos de 50% das células tumorais e aquelas com marcação em 50% ou mais células tumorais. Esses valores foram estabelecidos de acordo com os valores de *cutoff* calculados por meio de uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), definida com base na marcação imuno-histoquímica de BRAF e a presença da mutação V600E do gene *BRAF* (Figura 7).

A curva ROC representa um método efetivo de avaliação da performance de um teste diagnóstico. É definida como a plotagem da sensibilidade do teste (eixo y) *versus* sua especificidade ou taxa de falsos positivos (eixo x). A medida combinada de sensibilidade e especificidade do teste é definida pela área sob a curva (AUC, do inglês: *area under the curve*), que varia entre 0 e 1. Um teste diagnóstico com um

AUC maior que 0,5 é, portanto, melhor que um que utiliza um valor de cutoff aleatório (Park et al, 2004).

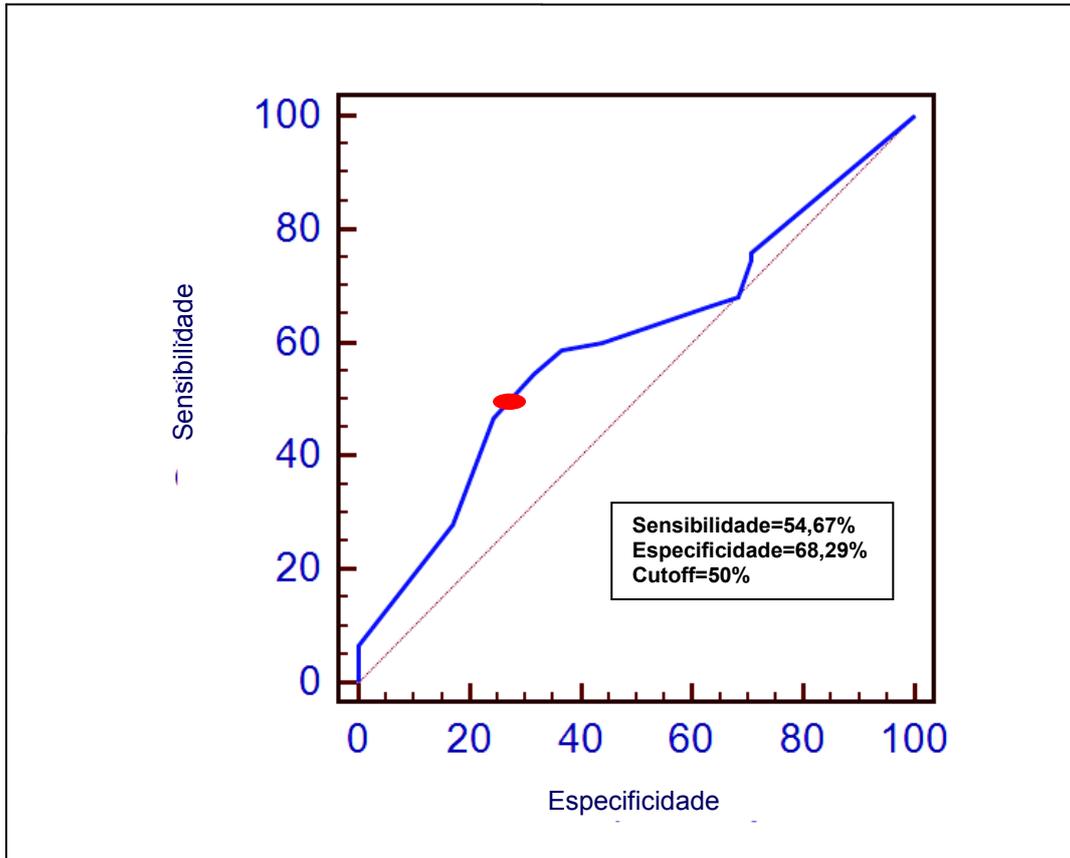


FIGURA 7. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Área sob a curva = 0,596

Dentre os carcinomas papilíferos de tireóide estudados, 62 casos (53,4%) apresentaram detecção imuno-histoquímica de BRAF em menos de 50% das células tumorais (Figura 9) e 54 casos (46,6%) apresentaram detecção de BRAF em 50% ou mais células tumorais (Figura 10 e 11), sendo esses casos considerados hiperexpressos.

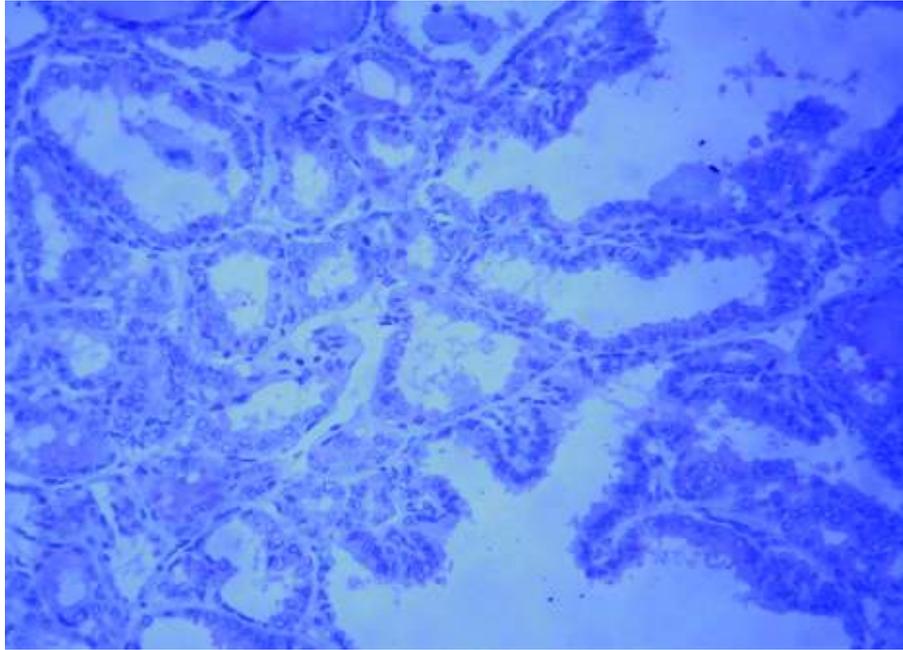


FIGURA 8: Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico da detecção negativa de BRAF em carcinoma papilífero de tireóide. Aumento x 100.

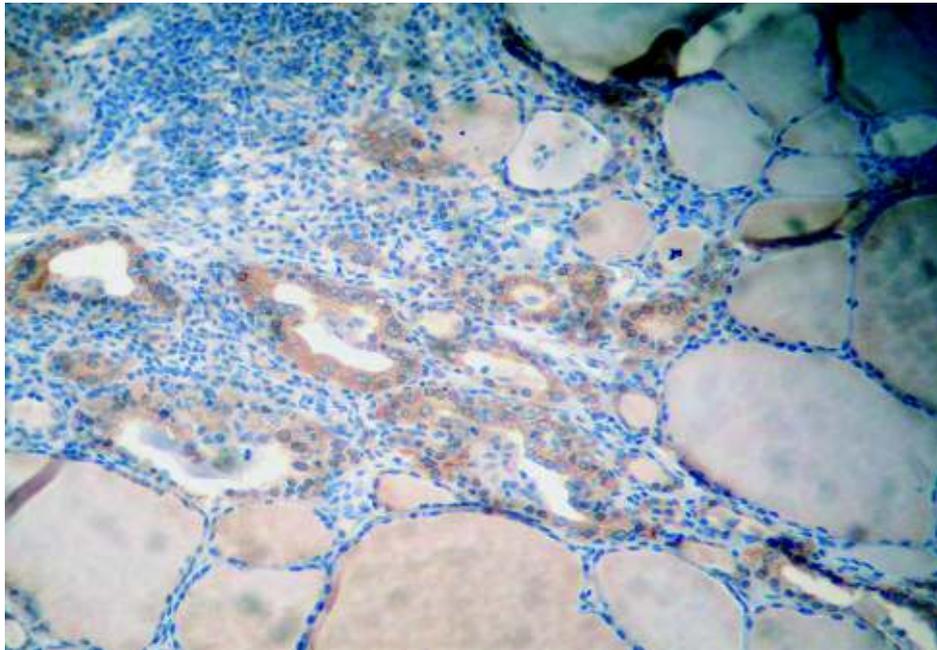


FIGURA 9: Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico da detecção de BRAF em menos de 50% das células tumorais de carcinoma papilífero de tireóide. Aumento x 100.

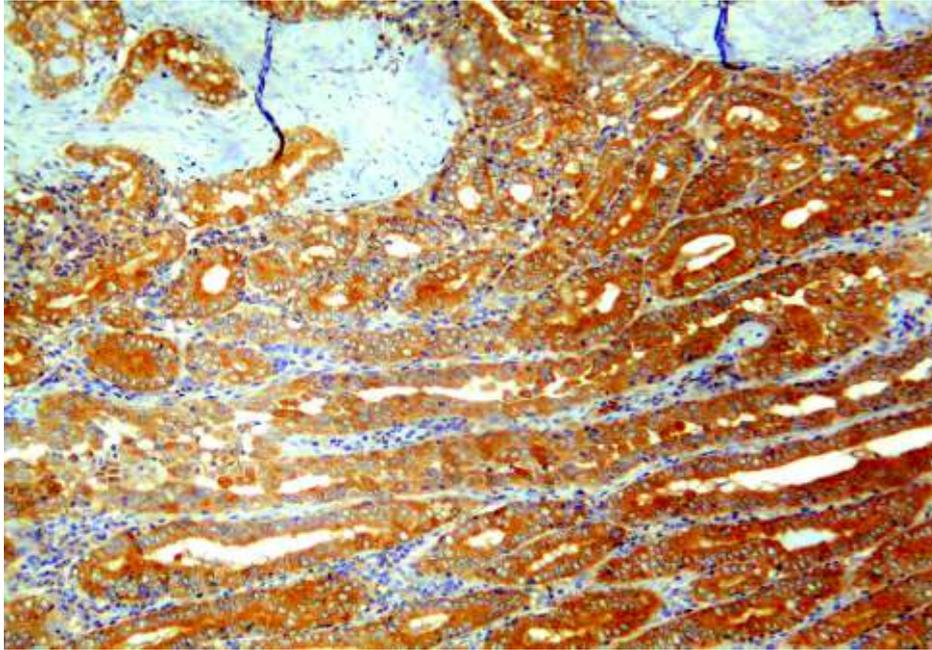


FIGURA 10: Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico da detecção de BRAF em 50% ou mais células tumorais de carcinoma papilífero de tireóide. Aumento x 100.

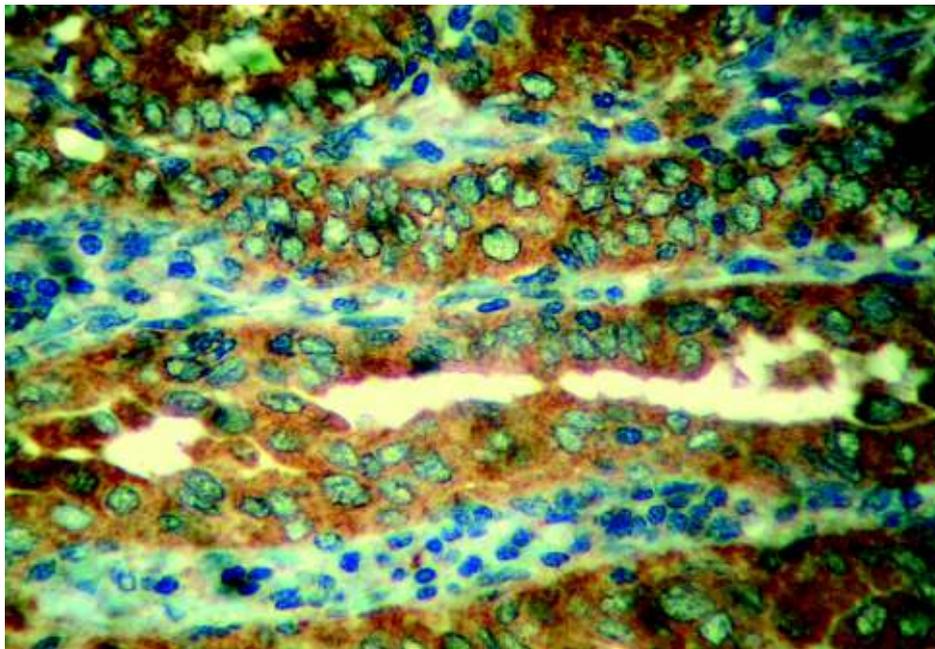


FIGURA 11: Fotomicrografia mostrando o perfil imuno-histoquímico da detecção de BRAF em 50% ou mais células tumorais de carcinoma papilífero de tireóide. Aumento x 200.

4.3 Análise da mutação V600E do gene *BRAF* nos carcinomas papilíferos de tireóide

A mutação T1799A do gene *BRAF*, que resulta na substituição V600E na proteína BRAF foi avaliada nos carcinomas papilíferos de tireóide por meio de PCR e RFLP. A mutação V600E de BRAF foi detectada em 74 dos 116 casos (63,37%) de CPT analisados neste estudo (Tabela 5).

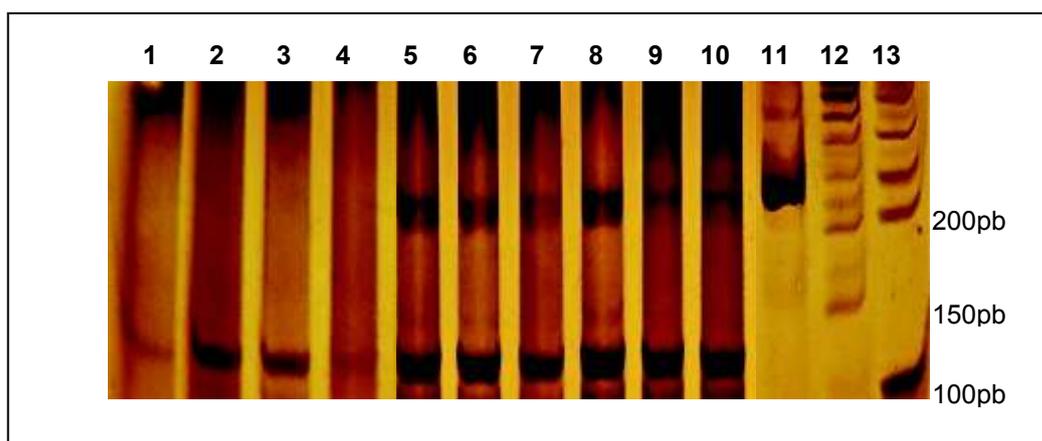


FIGURA 12. Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata, mostrando produtos de restrição de um fragmento do gene *BRAF* com 224 pares de bases, contendo ou não a mutação T1799A, cortado com a enzima *TspRI*. A presença da mutação T1799A resulta na formação de quatro fragmentos com 212-pb, 125-pb, 87-pb e 12-pb (canaletas 5, 6, 7, 8 e 9), enquanto que o alelo selvagem resulta na formação de três fragmentos contendo 125-pb, 87-pb e 12-pb (canaletas 1,2,3 e 4). A canaleta 10 apresenta uma amostra de DNA obtido de melanoma contendo a mutação T1799A. A canaleta 11 apresenta o fragmento de 224-pb não-digerido. As canaletas 12 e 13 apresentam bandas correspondentes ao padrão de peso molecular de DNA com 50-pb e 100-pb, respectivamente.

4.4 Análise das possíveis associações entre a detecção imuno-histoquímica de BRAF e os aspectos clínico-patológicos dos carcinomas papilíferos de tireóide

As amostras de carcinomas papilíferos de tireóide analisadas neste estudo foram divididas em dois grupos de marcação para BRAF, ou seja, aquelas com marcação em menos de 50% das células tumorais e aquelas com marcação em 50% ou mais células tumorais. A tabela 4 mostra as associações investigadas entre os aspectos clinicopatológicos e a expressão da proteína BRAF nos dois grupos de casos estudados. Neste trabalho, não foram observadas associações estatísticas significativas entre a expressão da proteína BRAF e os seguintes aspectos: gênero, idade, presença de metástases linfonodais e tamanho dos tumores. Entretanto,

associações estatísticas significativas foram demonstradas entre a expressão da proteína BRAF e a presença de metástases à distância ($p=0,0001$); a extensão extra-tireoideana do tumor ($p=0,0183$) e a presença da mutação V600E do gene *BRAF* ($p=0,0039$). Há que se ressaltar que associação entre a expressão de BRAF e metástases à distância foi inversa, ou seja, dentre os quatro CPT que apresentaram metástases à distância, três apresentaram expressão de BRAF menor que 50% e somente um apresentou expressão de BRAF $\geq 50\%$.

Tabela 4. Análise univariada investigando as possíveis associações entre os aspectos clínicos e a expressão da proteína BRAF em 116 pacientes com CPT

Parâmetro	BRAF <50%	BRAF $\geq 50\%$	n	p	Teste
Gênero					
Feminino	43(48,9%)	45(51,1%)	88	0.0871	Fischer
Masculino	19(67,9%)	9(32,1%)	28		
Idade					
<45 anos	48(57,1%)	36(42,9%)	84	0.2172	Fischer
≥ 45 anos	14(43,7%)	18(56,3%)	32		
Estadiamento T					
T1 + T2	53(54,1%)	45(45,9%)	98	0.8010	Fischer
T3 + T4	9 (50,0%)	9 (50,0%)	18		
Estadiamento N					
N0	35(54,7%)	29(45,3%)	64	0.9126	Chi-quadrado
N1	27(51,9%)	25 (48,1%)	52		
Estadiamento M					
Presente	3(75%)	1(25%)	4	0.0001 ★	Fischer
Ausente	59(52,68%)	53(47,32%)	112		
Extensão extra-tireoideana					
Presente	31(44,29%)	39(55,71%)	70	0.0183 ★	Fischer
Ausente	28(68,30%)	13(31,70%)	41		
Não consta(5)					
Mutação V600E BRAF					
Positiva	32(43,24%)	42(56,76%)	74	0.0039 ★	Fischer
Negativa	30(71,43%)	12(28,57%)	42		

★ Associações estatisticamente significativas

4.5 Análise das possíveis associações entre a presença da mutação V600E do gene *BRAF* e os aspectos clínico-patológicos dos carcinomas papilíferos de tireóide

As amostras de carcinomas papilíferos de tireóide analisadas neste estudo foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou ausência da mutação V600E do gene *BRAF*. A tabela 5 mostra as associações investigadas entre os aspectos clínicos e a mutação V600E do gene *BRAF* nos 116 pacientes deste trabalho. A análise dos 116 casos de carcinomas papilíferos estudados não demonstrou associações estatísticas significativas entre a presença da mutação V600E do gene *BRAF* e os seguintes aspectos: gênero, idade, tamanho dos tumores, metástases à distância e a extensão extra-tiroidiana do tumor. Entretanto, associações estatísticas significativas foram demonstradas entre a presença da mutação V600E e os seguintes aspectos: presença de metástases linfonodais ($p=0,0385$) e expressão da proteína *BRAF* ($p=0,0063$) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise univariada investigando as possíveis associações entre os aspectos clínicos e a mutação V600E do gene *BRAF* em 116 pacientes com CPT

Parâmetro	V600E(+)	V600E(-)	n	p	Teste
Gênero Feminino	59(67,1%) 15(53,6%)	29(32,9%) 13(46,4%)	88 28	0,2591	Fischer
Idade	51(60,7%) 23(71,9%)	33(39,3%) 9(28,1%)	84 32	0,2888	Fischer
Estadiamento T	64(65,3%) 10(55,5%)	34(34,7%) 8(44,5%)	98 18	0,4363	Fischer
Estadiamento N	35(54,69%) 39(75,0%)	29(45,31%) 13(25,0%)	64 52	0,0385 ★	Chi-quadrado
Estadiamento M	2(50,0%) 72(64,29%)	2(50,0%) 40(35,71%)	4 112	0,6198	Fischer
Extensão extra-tireoideana	48(68,6%) 25(60,9%)	22(31,4%) 16(39,1%)	70 41	0,544	Chi-quadrado
*Não consta (5)					
Expressão <i>BRAF</i>	32(51,6%) 42(77,8%)	30(48,4%) 12(22,2%)	62 54	0,0063 ★	Chi-quadrado

★ Associações estatisticamente significativas

5. DISCUSSÃO

Ressaltando a necessidade de indicadores mais precisos para diagnóstico e prognóstico do CPT, este é o primeiro trabalho que avaliou a associação entre a presença da mutação V600E de *BRAF* e a hiperexpressão da proteína BRAF, por imuno-histoquímica, em casos de carcinoma papilífero da tireóide.

Dois trabalhos recentes investigaram o valor prognóstico da expressão da proteína BRAF utilizando a imuno-histoquímica. Em um deles, a expressão de BRAF em CPT foi significativamente mais elevada do que em lesões tireoideanas benignas. Dentre as amostras de CPT avaliadas no estudo, a detecção da proteína foi mais alta no grupo que apresentou metástases linfonodais (Feng et al, 2011). Investigações anteriores sugeriram que um dos mecanismos de hiperexpressão da proteína seria o ganho do número de cópias do gene *BRAF* (Ciampi et al, 2005). Amplificações gênicas são eventos comuns em alguns tumores (Dantas et al, 2009). O trabalho de Feng, assim como o nosso, utilizou em suas análises imuno-histoquímicas, o anticorpo BRAF (clone F-7) da Santa Cruz *Biotechnology Inc.* Contudo, não foram realizadas no referido estudo, análises moleculares, definindo se esses tumores possuíam ou não a mutação V600E no gene *BRAF*. Além disso, o estudo de Feng et al (2011) utilizou um *cutoff* diferente do utilizado em nosso estudo, considerando positivos os casos que apresentaram expressão de BRAF em mais de 20% das células tumorais. A relevância do nosso estudo reside justamente no fato de termos analisado a expressão da proteína BRAF e sua possível associação com a mutação V600E do gene *BRAF*, possibilitando ainda o estudo de associações entre esses dois eventos e os aspectos clínicos dos mesmos tumores.

O trabalho de Feng, assim como o nosso, destaca a importância da imuno-histoquímica para a detecção da proteína BRAF, usando o anticorpo BRAF (clone F-7 Santa Cruz *Biotechnology Inc*) e contraria um estudo anterior (Kondo et al, 2007), no qual os autores não observaram associação significativa entre a hiperexpressão de BRAF e a presença da mutação V600E no gene *BRAF*. Entretanto, há que se ressaltar que este último estudo (Kondo et al, 2007) utilizou um anticorpo policlonal (sc-9002) diferente do utilizado em nosso estudo e no estudo de Feng et al (2011).

Outro trabalho recente (Capper et al, 2011), descreveu o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal específico para a forma mutada de BRAF (BRAF V600E), com o objetivo de distinguir a expressão das formas mutadas e selvagens em amostras de CPT e melanomas fixados em formol e emblocados em parafina. Neste estudo, as amostras tumorais foram avaliadas por PCR e sequenciamento direto de DNA e a detecção da proteína BRAF empregou a imuno-histoquímica. Os autores concluíram que a imuno-histoquímica, usando anticorpo BRAF (clone VE1), pode facilitar substancialmente a análise molecular de *BRAF* para fins de diagnóstico, prognóstico e predição, principalmente em casos com resultados incertos ou com material insuficiente para análises moleculares, ou ainda, pode ser utilizada como uma substituta para o teste genético em determinadas situações clínicas (Capper et al, 2011)

A proteína BRAF é uma serina/treonina quinase efetora da via MAP quinase, ativada pela proteína RAS ligada ao GTP, que, por sua vez, quando fosforilada (forma ativa) ativa a proteína MEK por fosforilação, dando prosseguimento à transdução dos sinais da via. Mutações somáticas no gene *BRAF* foram relatadas primeiramente em melanomas malignos por Davies e colaboradores e também no câncer de ovário e colorretal (Davies et al, 2002). A transversão T1799A no exon 15 do gene *BRAF*, que promove a troca do aminoácido valina para ácido glutâmico (mutação V600E), é a mutação mais comum desse gene no CPT. Tal mutação torna a proteína BRAF constitutivamente ativada, promovendo um ganho de função independente de sinais ativadores, levando à ativação constitutiva da via MAPK, o que pode resultar no desenvolvimento de neoplasia maligna da tireóide (Tang et al 2010). Pacientes com CPT e pior prognóstico, como aqueles que apresentam metástases linfonodais, metástase a distância, extensão-extratireoideana, entre outros, são tratados com base nas características biológicas do tumor, e alterações que dependem de variações do gene e disfunção e/ou superexpressão de proteínas vitais. Portanto, a hiperexpressão de proteínas específicas pode ser um marcador para eventos moleculares em células malignas, auxiliando na previsão do comportamento mais agressivo do tumor (Capper et al, 2011).

Nosso estudo demonstrou uma associação significativa entre a mutação V600E de *BRAF* e a hiperexpressão de BRAF ($\geq 50\%$ das células tumorais), nos

CPT. Apesar da presença da mutação V600E de *BRAF* ter sido associada à presença de metástases linfonodais, nos CPT analisados, a hiperexpressão de *BRAF* não foi associada a este importante parâmetro clínico. A hiperexpressão de *BRAF* deve representar um evento importante na carcinogênese do CPT, entretanto, os mecanismos moleculares implicados no controle da expressão desse gene e na maior estabilidade desta proteína devem ser ainda elucidados, a fim de se estabelecer a real importância clínica deste marcador.

Vários estudos avaliaram possíveis associações entre a mutação V600E de *BRAF* e as características clínico-patológicas dos CPT, tais como metástases linfonodais, metástases à distância, estágios clínicos mais avançados do tumor, extensão extra-tireoideana, recorrência, idade mais avançada e gênero masculino. Alguns resultados detectaram entre tais fatores, associações significativas (Salvatore et al, 2006 Xing, 2010). Uma meta análise revisou inúmeros estudos sobre a mutação V600E do gene *BRAF* nos CPT, mostrando associação estatística significativa entre a mutação e as características de maior agressividade dos tumores, incluindo a extensão extra-tireoideana, metástases linfonodais, estágios tumorais mais avançados e recorrência (Lee JH et al, 2007). Tal estudo também reportou uma associação significativa entre essas mutações e um menor tamanho de tumor, indicando que a mutação deve ocorrer nos estágios iniciais da doença (Xing, 2005).

Pacientes com tumores de alto risco são tratados de forma mais intensiva com terapias adjuvantes, além de passarem por acompanhamento mais frequente (ATA-Cooper et al, 2009). Alguns fatores de risco, tais como a integralidade de ressecção, só podem ser atribuídos no pós-operatório depois que as características histopatológicas estiverem disponíveis. Dividir os pacientes com PTC em categorias de riscos diferentes poderia certamente colaborar para otimização dos procedimentos cirúrgicos iniciais. Além da sua forte correlação com CPT, a mutação V600E no gene *BRAF* é bem descrita por associar-se com mau prognóstico (Lupi et al, 2007; Kebebew et al, 2007; Elisei et al, 2008). Parâmetros clinicopatológicos estabelecidos para representar o comportamento agressivo e mau prognóstico incluem a extensão extra-tireoideana, multicentricidade, recorrência local, metástase para linfonodos e metástases à distância (Kebebew et al, 2007). Lupi e

colaboradores, em 2007, avaliaram 500 casos de CPT, dos quais 43% foram positivos para a mutação V600E, concluindo desta forma, que os casos positivos para a mutação, tinham uma maior proporção de extensão extra-tireoideana, metástase linfonodal, multicentricidade e doença em estágio avançado em relação aos casos de CPT que não apresentaram a mutação (Lupi et al, 2007). No mesmo ano, Kebebew e colegas realizaram o seguimento de 314 pacientes com câncer de tireóide por uma média de 6 anos e verificaram que a mutação V600E no gene *BRAF* era independente da associação com CPT recorrente (Kebebew et al, 2007).

A Tabela1 desse estudo mostra uma revisão de alguns artigos científicos que demonstraram associações entre a mutação V600E de *BRAF* e metástase nos CPT (Namba et al, 2003; Kim K.H et al, 2004; Xing et al, 2005; Kim, J et al, 2006; Kebebew et al, 2007; Nakayama et al, 2007; Lupi et al, 2007; Frasca et al, 2008; Xing M et al, 2009; Basolo et al, 2010). No entanto, outros autores (tabela 2) não encontraram associação entre a mutação V600E de *BRAF* e metástase nos CPT (Riesco-Eizaguirre et al, 2006; Durante et al, 2007; Kwak et al, 2009; Hwang et al, 2010; Lee JH et al, 2010). Esta discrepância pode ser explicada por meio de vários argumentos. Os estudos nem sempre usam o mesmo método para detectar a mutação. Mais de 80% dos estudos têm analisado a mutação V600E em amostras parafinadas, fixadas em formalina (Frasca et al, 2008; Lupi et al, 2007; Riesco-Eizaguirre et al, 2006; Kim K.H et al, 2004; Namba et al, 2003; Kim, J et al, 2006), enquanto outros utilizaram espécimes cirúrgicos de tecidos frescos congelados (Nakayama et al, 2007; Oler et al, 2008; Fugazzola et al, 2006; Durante et al, 2007), ou mesmo os dois tipos de espécimes (Kwak et al, 2009; Kebebew et al, 2007; Xing et al, 2005). Alguns estudos empregaram o método de análise de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) para detectar a mutação (Lupi et al, 2007; Riesco-Eizaguirre et al, 2006; Durante et al, 2007), enquanto outros usaram sequenciamento direto após a amplificação por PCR (Kwak et al, 2009; Frasca et al, 2008; Nakayama et al, 2007; Kebebew et al, 2007; Xing et al, 2005; Kim,K.H et al, 2004; Namba et al, 2003; Oler et al, 2008; Kim, J et al, 2006; Ito et al, 2009; Liu et al, 2005). Estudos, assim como o nosso, realizaram análise molecular da mutação V600E do gene *BRAF* por meio de PCR e RFLP (Zatelli et al, 2009; O'Neill et al, 2010; Kwak et al, 2010; Cañadas et al, 2011; Smith et al, 2011).

Grande parte dos estudos realizou análises estatísticas univariadas (Riesco-Eizaguirre et al, 2006; Kim, K.H et al, 2004; Namba et al, 2003; Oler et al, 2008) e o número de pacientes variou muito, de 42 (Zuo et al, 2007) até 631 (Ito et al, 2009). Além disso, os CPT possuem variantes histológicas e algumas já são conhecidas por ter mau prognóstico, como a variante de células altas, que pode representar até 6% das amostras, além da variante folicular de CPT que pode representar até 37% das amostras (Riesco-Eizaguirre et al, 2006). Alguns trabalhos encontraram uma associação entre a mutação a V600E e o estadiamento TNM, em uma análise univariada (Nakayama et al, 2007; Lupi et al, 2007; Kebebew et al, 2007; Riesco-Eizaguirre et al, 2006; Xing et al, 2005; Namba et al, 2003; Kim, J et al, 2006). Outros estudos não observaram qualquer associação entre a mutação V600E e o estadiamento TNM (Fugazzola et al, 2006; Durante et al, 2007; Ito et al, 2009). A mutação V600E associou-se de forma direta com tamanho tumoral em quatro estudos (Kwak et al, 2009; Frasca et al, 2008; Oler et al, 2008; Kim J et al, 2006) e indireta em um estudo (Xing et al, 2005). Alguns estudos encontraram uma associação entre mutação V600E e metástase linfonodal no momento do diagnóstico (Frasca et al, 2008; Nakayama et al, 2007; Lupi et al, 2007; Kebebew et al, 2007; Xing et al, 2005; Kim, K.H et al, 2004; Oler et al, 2008; Kim J et al, 2006). Nosso estudo demonstrou associação significativa entre a mutação V600E do gene *BRAF* e a presença de metástases linfonodais ($p=0,0385$), validando esse ensaio molecular no manejo clínico dos pacientes com CPT e corroborando com os inúmeros estudos descritos na Tabela 1.

De acordo com os nossos resultados, a presença da mutação V600E do gene *BRAF* também esteve associada à hiperexpressão de *BRAF* nos CPT. A hiperexpressão de *BRAF*, por sua vez, associou-se de forma significativa com extensão extra-tireoideana do tumor ($p=0,0183$), um aspecto importante associado ao pior prognóstico dos CPT.

Quanto à associação inversa entre a hiperexpressão de *BRAF* e a presença de metástases à distância, uma série maior de casos deve ser analisada, vez que neste estudo, somente quatro casos metastáticos estavam presentes e somente um apresentou hiperexpressão de *BRAF*.

A principal limitação do nosso trabalho foi a impossibilidade de acompanhamento dos pacientes do estudo. Muitos deles, iniciaram o tratamento no Hospital Araújo Jorge e depois não retornaram à instituição para acompanhamento. Desta forma nos prontuários médicos não foram informadas as condutas clínicas subsequentes à cirurgia referentes ao tratamento dos mesmos, impossibilitando o seguimento clínico ou o acesso às informações exatas referentes ao aparecimento de metástases à distância após a cirurgia, dados de recorrência e outros fatores de pior prognóstico.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que a presença da mutação V600E do gene *BRAF* é um evento mutacional comum nos CPT, presente em 74 dos 116 casos analisados (63,37%). A mutação V600E do gene *BRAF* foi mais comum nos CPT metastáticos, pois esteve presente em 75% desses tumores e associou-se de forma significativa com a presença de metástases linfonodais ($p=0,0385$).

Quanto a expressão da proteína BRAF, verificou-se que esta também representou um evento molecular comum nos CPT, pois esteve hiperexpressa (acima de 50%) em 54 dos 116 casos analisados (46,55%). A hiperexpressão de BRAF associou-se à fatores de pior prognóstico para os CPT, como extensão extra-tireoideana do tumor ($p=0,0183$) e a presença da mutação V600E do gene *BRAF* ($0,0039$).

Como perspectivas futuras sugerimos que uma casuística maior de carcinomas papilíferos da tireóide, incluindo número significativo de casos metastáticos, seja investigada para análise de expressão da proteína BRAF, a fim de elucidar de forma mais precisa o papel prognóstico dessa proteína.

Sugerimos ainda que estudos funcionais sejam desenvolvidos, a fim de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no controle da expressão do gene *BRAF* e nos eventos celulares envolvidos na estabilização e degradação da proteína BRAF.

7. REFERÊNCIAS

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al: Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(2):216.

Molecular Pathogenesis of Thyroid Cancer. Asuragen Inc, 2011.

Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR et al: American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19:1167.

Baloch ZW, LiVolsi VA: Our approach to follicular-patterned lesions of the thyroid. *J Clin Pathol* 2007; 60(3):244.

Basolo F, Giannini R, Monaco C, et al: Potent Mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene Correlates with its Prevalence in Tall – Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160(1):247.

Basolo F, Torregrossa L, Giannini R et al: Correlation between the *BRAF* V600E Mutation and Tumor Invasiveness in Papillary Thyroid Carcinomas Smaller than 20 Millimeters: Analysis of 1060 Cases. *J Clin Endocrinol Metab*, September 2010; 95(9):4197.

Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al: Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010; (in press).

Boone RT, Fan CY, Hanna EY: Well-differentiated carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Clin North Am* 2003; 36:73.

Brose MS, Troxel AB, Redlinger M et al: Effect of BRAFV600E on response to sorafenib in advanced thyroid cancer patients. *J Clin Oncol* 2010; 28:6002.

Bucci A, Shore Freedman E, Gierlowski T, et al: Behavior of Small Thyroid Cancers Found by Screening Radiation - Exposed Individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8):371.

Canadas GM, López TCM, Becerra MP et al: BRAF(T1799A) mutation in the primary tumor as a marker of risk, recurrence, or persistence of papillary carcinoma. *Endocrinol Nutr.* 2011 apr; 58(4):175.

Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, et al: Risk of thyroid cancer after exposure to 131I in childhood. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(10):724.

Capper D, Preusser M, Habel A et al: Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 2011; 122:11.

Chow SM, Law SC, Mendenhall WM et al: Follicular thyroid carcinoma: prognostic factors and the role of radioiodine. *Cancer* 2002; 95:488.

Ciampi R, Zhu Z, Nikiforov YE: BRAF copy number gains in thyroid tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *Endocr Pathol* 2005;16: 99.

Clereci, M.T.P.S. et al. Metodologia para determinação qualitativa de iodo em amostras de sal de cozinha por cromatografia em papel– uma aula prática.

AFILIAÇÃO - 1 Pós-doutoranda DTA-FEAUnicamp - Campinas-SP 2004. Disponível em <[http:// www.slbg.org.br/revista/mtdidatica.](http://www.slbg.org.br/revista/mtdidatica)> acesso em Out. 2006.

Coelho SM, Corbo R, Buescu A et al: Retinoic acid in patients with radioiodine non-responsive thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2004; 27:334.

Coeli CM, Brito AS, Barbosa F et al: Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005; 49: 503.

Cohen EG, Tuttle RM, Kraus DH: Postoperative management of differentiated thyroid cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 2003; 36:129.

Cohen Y, Xing M, Mambo E et al: BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95: 625.

Curado MP, Martins E: Incidência e mortalidade dos cânceres de cabeça e pescoço no Brasil. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço* 2006; 35 (3): 136.

Dean DS, Hay ID. *DABBS D Diagnostic Immunohistochemistry* 2006, Second Edition.

Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control* 2000;7:229.

Dantas ELR, Sá FHL, Carvalho SMF et al: Genética do Câncer Hereditário. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2009; 55: 263.

Davies H, Bignell R G, Cox Charles et al: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; vol 417: 27.

Demidchik YE, Saenko VA, Yamashita S: Childhood Thyroid Cancer in Belarus, Russia, and Ukraine after Chernobyl and at Present. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51.

Durante C, Haddy N, Baudin E et al: Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 9: 2892.

Durante C, Puxeddu E, Ferretti E et al: BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol. Metab* 2007; 92: 2840.

Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT et al: Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer* 2006; 95: 581.

Elisei R, Ugolini C, Viola D et al: BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: A 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3943.

Feng L, Li M, Zhang Q.P et al: Utility of BRAF protein overexpression in predicting the metastasis potential of papillary thyroid carcinoma. *Oncology Letters* 2011; 2: 59.

Flaherty KT: Sorafenib in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 747.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB et al: Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 809.

Frasca F, Nucera C, Pellegriti G et al: BRAF (V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 191.

Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N et al: Correlation between BRAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 455.

Gheriani H. Update on epidemiology classification, and management of thyroid cancer. *Libyan Journal of Medicine* 2006; vol 1.

Gimm O: Thyroid cancer. *Cancer Lett* 2001; 163:143.

Giusti F, Falchetti A, Franceschelli F et al: Thyroid Cancer: Current Molecular Perspectives. *Journal of Oncology* Vol 2010 doi:10.1155/2010/351679.

Graf H: Poorly differentiated thyroid carcinomas: new therapeutic considerations. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(6):991.

Hadjieva T: Scoring patients' risk in differentiated thyroid cancer. *Onkologie* 2001; 24:561.

Harrison. *Medicina Interna*. São Paulo. 15.e. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

Hatzivassiliou G, Song K, Yen I et al: RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010; 464: 431.

Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S et al: Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010; 140: 209.

Hemminki K, Eng C, Chen B: Familial Risks for Nonmedullary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(10):5747.

Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, et al: Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(26):15044.

Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, et al: Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 2000; 89: 202.

Huyck T, Mark Agulnik M. *Molecular Therapies in Thyroid Cancer*. Pharmaceuticals 2011; 4: 91.

Hwang J, Shin H J, Han K B et al: Papillary Thyroid Carcinoma With *BRAFV600E* Mutation: Sonographic Prediction. *American Roentgen Ray Society* 2010, *AJR*:194.

Ito Y , Yoshida H , Maruo R et al : *BRAF* mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J* 2009; 56: 89.

Joseph EW, Pratilas CA, Poulikakos PI, et al: The *RAF* inhibitor PLX4032 inhibits *ERK* signaling and tumor cell proliferation in a V600E *BRAF*-selective manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 14903.

Kent WD, et. Al: Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ* 2007 Nov 20; 177(11): 1357.

Kebebew E, Weng J, Bauer J et al: The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007; 246: 466.

Kefford R, Arkenau H, Brown MP, et al: Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28: (suppl; abstr 8503).

Kim KH, Kang DW, Kim SH et al: Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 2004; 45: 818.

Kim J, Giuliano AE, Turner RR et al: Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 2006; 244:799.

Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, et al: The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med*. 2002; 2002:1.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL: Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 292.

Kondo T, Nakazawa T, Murata S et al: Enhanced BRAF protein expression is independent of V600E status in thyroid carcinomas. *Human Pathol* 2007; 38: 1810.

Knobel M, Medeiros Neto G: Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51: 701.

Kwak JY, Kim EK, Chung WY et al: Association of BRAFV600E Mutation with Poor Clinical Prognostic Factors and US Features in Korean Patients with Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Radiology* 2009; 253:854.

Kwak JY, Kim EK, Kim JK et al: Dual priming oligonucleotide-based multiplex PCR analysis for detection of BRAFV600E mutation in FNAB samples of thyroid nodules in BRAFV600E mutation-prevalent area. *Head Neck* 2010; 32:490.

Yang H, Higgins B, Kolinsky K, et al: RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res* 2010; 70: 5518.

La Quaglia MP, Black T, Holcomb GW, et al: Differentiated thyroid cancer: clinical characteristics, treatment, and outcome in patients under 21 years of age who present with distant metastases. A report from the Surgical Discipline Committee of the Children's Cancer Group. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 955.

Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic Significance of BRAF V600E Mutation in Papillary Carcinomas of the Thyroid. *CANCER* July 1, 2007 / Volume 110 / Number 1.

Lee J, Soh EY. Differentiated thyroid carcinoma presenting with distant metastasis at initial diagnosis clinical outcomes and prognostic factors. *Ann Surg* 2010; 251:114.

Lee JH, Choi J, Hwang ST, et al: Detection of *BRAF* Mutations in Thyroid Nodules by Allele-Specific PCR Using a Dual Priming Oligonucleotide System. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 802.

Liu RT, Chen YJ, Chou FF et al: No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol* 2005; 63:461.

Liska J, Altanerova V, Galbavy S, et al: Thyroid Tumors: Histological Classification and Genetic Factors Involved in the Development of Thyroid Cancer. *Endocrine Regulations* 2005; 39: 73.

Lupi C, Giannini R, Ugolini C et al: Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92: 4085.

Maciel RM, Kimura ET, Cerutti JM: Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). Arq Bras Endocrinol Metab 2005; 49(5):691.

Mazzaferri EL, Kloos RT: Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:1447.

Meyer ELS, Wagner MS, Maia AL. Expressão das Iodotironinas Desiodases nas Neoplasias Tireoidianas. Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51:5.

Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, et al: The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. J Clin Invest 2005; 115(4):1068.

Meier DA, Kaplan MM: Radioiodine uptake and thyroid scintiscanning. Endocrinol Metab Clin North Am 2001; 30: 291.

Milham S, Morgan LL: A new electromagnetic exposure metric high frequency voltage transients associated with increased cancer incidence in teachers in a California school. Am J Ind Med 2008.

Nakayama H, Yoshida A, Nakamura Y et al: Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas. Anticancer Res 2007; 27: 3645.

Namba H, Nakashima M, Hayashi T et al: Clinical implication of hot spot BRAF mutation,V599E, in papillary thyroid cancers. J. Clin. Endocrinol. Metab 2003; 88: 4393.

National Comprehensive Cancer Network, publicado em 2003, Clinical Practice Guidelines, vol 1. Disponível em URL: http://www.nccn.org/physician_gls/PDF/thyroid.pdf.

NCCN - Thyroid carcinoma practice guidelines – Disponível em URL: http://www.nccn.org/physician_gls/f_guidelines.html.

Nikiforov YE, Nikiforova MN: Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. Nature Reviews Endocrinology 2011; 7: 569.

Nikiforova MN, Nikiforov YE: Molecular Diagnostics and Predictors in Thyroid Cancer. Thyroid 2009; 19: 12.

Oler G, Camacho CP, Hojaij FC et al: Gene expression profiling of papillary thyroid carcinoma identifies transcripts correlated with BRAF mutational status and lymph node metastasis. Clin Cancer Res 2008; 14:4735.

Ohshima A, Yamashita H, Noguchi S, et al: Is a bilateral modified radical neck dissection beneficial for patients with papillary thyroid cancer? Surg Today 2002; 32:1027.

O'Neill CJ, Bullock M, Chou A,et al: BRAF(V600E) mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer. Surgery 2010; 148(6):1139.

Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, et al: European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *European Journal of Endocrinology* 2006;154: 787.

Park S Ho, Goo J M, Jo CH: Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve: Practical Review for Radiologists. *Korean J Radiol* 2004; 5: 11.

Peixoto MA, Taboada GF, Wagman MB, et al: Avaliação da Incidência e do Comportamento do Câncer de Tireóide em Pacientes Com Doença de Graves Submetidos a Tireoidectomia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47(5):566.

Pollock PM, Meltzer PS: Lucky draw in the gene raffle. *Nature* 2002; 417(6892):906.

Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, et al: BRAF V599E Mutation Is the Leading Genetic Event in Adult Sporadic Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5): 2414.

Puxeddu E, Moretti S: Clinical prognosis in BRAF-mutated PTC. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51: 736.

Quiros RM, Ding HG, Gattuso, et al: Evidence that One Subset of Anaplastic Thyroid Carcinomas Are Derived from Papillary Carcinomas due to BRAF and p53 Mutations. *Cancer* 2005; 103(11): 2261.

Reis DSM, Morihisa IA, Medeiros KC, et al: Câncer da tireóide em Goiânia: estudo descritivo de base populacional no período de 1988 a 2003. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço* 2008; 37(2): 62.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al: Bodymass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371: 569.

Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA et al. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 257.

Ronga G, Filesi M, Montesano T, Melacrinis FF, et al: Death from differentiated thyroid carcinoma: retrospective study of a 40-year investigation. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17: 507.

Sakoda LC, Horn-Ross PL: Reproductive and Menstrual History and Papillary Thyroid Cancer Risk: The San Francisco Bay Area Thyroid Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:51.

Salvatore G, Giannini R, Faviana P, et al: Analysis of BRAF Point Mutation and RET/PTC Rearrangement Refines the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10): 5175.

Salvatore G, De Falco V, Salerno P et al. BRAF Is a Therapeutic Target in Aggressive Thyroid Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1623.

Sarlis NJ. Metastatic thyroid cancer unresponsive to conventional therapies: novel management approaches through translational clinical research. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2001;1:103.

Schlumberger M, Berg G, Cohen O, et al: Followup of low-risk patients with differentiated thyroid carcinoma: a European perspective. *Eur J Endocrinol* 2004;150:105.

Sheu SY, Schwertheim S, Worm K, et al: Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: lack of BRAF mutation but occurrence of RET/PTC rearrangements. *Mod Pathol* 2007; 20(7):779.

Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid Cancer Epidemiology and Prognostic Variables. *Clinical Oncology* 2010; 22: 395.

Slough M. Cristian, Randolph W Gregory. Workup of Well-Differentiated Thyroid Carcinoma. *Cancer Control* April 2006; 13(2).

Smailyte G, Miseikyte-Kaubriene E, Juozas K. Increasing thyroid cancer incidence in Lithuania in 1978 – 2003. *BMC Cancer* 2006; 6:284.

Smith RA, Salajegheh A, Weinstein S et al: Correlation between BRAF mutation and the clinicopathological parameters in papillary thyroid carcinoma with particular reference to follicular variant. *Hum Pathol* 2011; 42: 500.

Stanojevic B, Dzodic R, Saenko V, et al: Mutational and clinico-pathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbia. *Endocrine Journal* 2011; 58 (5): 381.

Tang KT, Lee CH. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. *J Chin Med Assoc* 2010; vol 73 No 3.

Trimboli P, Ulisse S, Graziano FM, et al: Trend in thyroid carcinoma size, age at diagnosis, and histology in a retrospective study of 500 cases diagnosed over 20 years. *Thyroid* 2006; 16(11):1151.

Tronko MD, Howe GR, Bogdanova TI, et al: A Cohort Study of Thyroid Cancer and Other Thyroid Diseases After the Chernobyl Accident: Thyroid Cancer in Ukraine Detected During First Screening. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(13): 897.

Trovisco V, Soares P, Preto A, et al: Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma – great expectations. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51: 643.

Tsai J, Lee JT, Wang W, et al: Discovery of a selective inhibitor of oncogenic BRAF kinase with potent antimelanoma activity. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 3041.

Ward LS, Assumpção LVM. Câncer diferenciado da tireóide: fatores prognósticos e Câncer Diferenciado da Tireóide: Fatores Prognósticos tratamento. Arq Bras Endo Metab 2004; 48:126.

Ward LS. Epidemiologia do Câncer da Tireóide no Brasil: Apontando Direções na Política de Saúde do País. Arq Bras Endocrinol Metab 2005; 49(4):474.

Ward LS, Morari EC, Leite JL, et al: Identifying a risk profile for thyroid cancer. Arq Bras Endocrinol Metabol 2007; 51: 713.

Ward LS, Graf H. Câncer da Tireóide: Aumento na Ocorrência da Doença ou simplesmente na sua Detecção? Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52(9).

Wada N, Duh QY, Sugino K, et al: Lymph node metastasis from 259 papillary thyroid microcarcinomas: frequency, pattern of occurrence and recurrence, and optimal strategy for neck dissection. Ann Surg 2003; 237: 399.

Weber F, Shen L, Aldred MA, et al: Genetic Classification of Benign and Malignant Thyroid Follicular Neoplasia Based on a Three-Gene Combination. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(5):2512.

Welker MJ, Orlov D: Thyroid nodules. Am Fam Physician 2003; 67: 559.

Willis RE. Human Gene Control by Vital Oncogenes: Revisiting a Theoretical Model and Its Implications for Targeted Cancer Therapy. Int. J. Mol. Sci. 2012;13: 316.

Willians, R. R. et al: Textbook of Endocrinology, 9 ed. 1998.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al: BAY 43–9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64:7099.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 245.

Xing M, Westra WH, Tufano RP et al: BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6373.

Xing M, Clark D, Guan H et al: BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2977.

Xing M. Prognostic Utility of *BRAF* Mutation in Papillary Thyroid Cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 321: 86.

Zabel EW, Alexander BH, Mongin SJ, et al: Thyroid cancer and employment as a radiologic technologist. *Int J Cancer* 2006; 119:1940.

Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S et al: BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsies. *Eur J Endocrinol* 2009; 161:467.

Zuo H, Nakamura Y, Yasuoka H et al: Lack of association between BRAF V600E mutation and mitogen-activated protein kinase activation in papillary thyroid carcinoma. *Pathol. Int* 2007; 57: 12.

8. ANEXOS

8.1 Protocolo CEP/ ACCG Nº 049/ 2010

PROCOLO CEP/ACCG Nº 049/2010

Goiânia, 02/12/2010

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dra. Vera Aparecida Saddi

PESQUISADORA PARTICIPANTE: Dra. Isabela Jubé Wastowski

TÍTULO: Mecanismos moleculares envolvidos no escape imunológico de tumores.

Área Temática: Grupo I – Genética Humana

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde/Medicina

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG /Setor de Cabeça e Pescoço, Departamento de Pele e Tórax e Setor de Anatomia Patológica.

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).

O CEP/ACCG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em pesquisa – Item 13*).


Dr. Cício Paulo Carneiro Filho
Vice-Coordenador 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

8.2 Aspectos Clínicopatológicos das doenças da tireóide-SAP-HAJ

ASPECTOS CLÍNICOPATOLÓGICOS DAS DOENÇAS DA TIREÓIDE – SAP – HAJ

IDENTIFICAÇÃO

Prontuário: _____ Data do Nascimento: ____/____/____
 Nome do Paciente: _____ Idade: _____
 Procedência: _____ Data do diagnóstico: ____/____/____
 Endereço e Telefone: _____
 Gênero: (1) – Masculino (2) – Feminino

DIAGNÓSTICO

Diagnóstico Citológico (P.A.A.F.) () – Não () – Sim, Padrão:
 (1) Papilífero (2) Follicular (3) Hurtle (4) Medular (5) Indiferenciado
 (6) Inflamatório (7) Suspeito

Hipótese diagnóstica: _____ Conduta: _____
 Biópsia de Congelação: () – Não () – Sim

Diagnóstico Histopatológico: () – Não () – Sim, Padrão:
 (1) Neoplasia (2) Sub-tipo tumoral (3) Bócio (4) Cisto (5) Tiroidite
 (1.1) Follicular (2.1) Usual (5.1) – Aguda
 (1.2) Papilar (2.2) Células altas (5.2) – Sub-aguda
 (1.3) Medular (2.3) Colunar (5.3) – Hashimoto
 (1.4) Indiferenciada (2.4) Esclerose difusa
 (1.5) Anaplásica (2.5) Hurtle
 (1.6) Metastática (2.6) Variante insular

CARACTERÍSTICAS TUMORAIS:

Tamanho da Peça: _____ Peso da Peça: _____
 Coloração do Material: _____ Consistência: _____
 Tamanho do Tumor: _____

Localização: (1)- LD (2)- LE (3)- Istmo Bilateral: _____
 Extensão extracapsular: (0) - Não (1) - Sim, _____
 Invasão Vascular: (0) - Não (1) - Sim, _____
 Atipia Nuclear: (1) – Baixa (2) – Moderada (3) - Acentuada
 Grau histológico: (1) – I (2) – II (3) – III

Linfonodos cervicais acometidos:
 (0) – Não (1) – Sim, quantos? _____ em _____
 Linfonodos mediastinais acometidos: (0) – Não (1) – Sim, quantos? _____ em _____
 Imuno-Histoquímica: () – Não () – Sim, Anticorpos e resultados:

AC1:
 AC2:

Estadiamento Clínico: (1) – I (2) – II (3) – III (4) – IV
 História Familiar de Câncer de Tireóide: (0) - Não (1) - Sim, _____

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS E RESULTADOS:

(1) - Diagnóstico clínico: _____ em ____/____/____
 (2) - US: _____ em ____/____/____
 (3) - PAAF: _____ em ____/____/____
 (4) - Cintilografia: _____ em ____/____/____
 (5) - Outro: _____ em ____/____/____

TRATAMENTO CIRÚRGICO: (1) – Tireoidectomia total (2) – Tireoidectomia parcial
 (3) – Istmetomia (4) – Lobectomia (5) – Dissecção nodal
 (6) – Totalização (7) – Lobectomia + Istmetomia

SEGUIMENTO DO PACIENTE:

() – Óbito Data do óbito: ____/____/____
 () – Vivo, com evidência da recidiva Data da recidiva: ____/____/____
 () – Vivo, sem evidência da doença Data do último controle: ____/____/____
 Intervalo Livre de Doença: _____ Sobrevida: _____
 Dados Coletados em ____/____/____ por: _____