



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS  
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**



**DANIELLE PESSÔA PEREIRA**

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO BRAF<sup>V600E</sup> EM CARCINOMA  
PAPILÍFERO DE TIREOIDE**

Salvador

2014

**DANIELLE PESSÔA PEREIRA**

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO BRAF<sup>V600E</sup> EM CARCINOMA  
PAPILÍFERO DE TIREOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos.

Salvador

2014

A Joseilton, pai querido, pelo amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Helton Estrela Ramos, por sua orientação e paciência ao longo desta jornada, e, principalmente, por incentivar e contribuir para a minha dedicação à pesquisa científica.

À Dra. Edna Kimura, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por compartilhar informações referentes à análise molecular do gene *BRAF*.

Ao Dr. Cláudio Rogério, Dr. Lobão e Dr. Luciano Espinheira, por terem acreditado e apoiado nosso projeto, contribuindo para a realização do nosso trabalho no Hospital São Rafael.

Ao Dr. Igor, por seu interesse e participação imprescindível para o desenvolvimento do estudo, a quem também atribuo o despertar do meu interesse pela área da Patologia.

Ao colega Joaquim, por ter compartilhado seu conhecimento clínico sobre o câncer de tireoide e estar sempre disponível nos momentos de dúvida.

Aos estudantes de Iniciação Científica, Mateus, Virna e Manuela, pelo auxílio na coleta de dados e pelos bons momentos.

À Taise, pelo auxílio prestado na rotina laboratorial.

Aos demais colegas do LET, em especial à Renata, pessoas que tive o prazer de conhecer e compartilhar momentos agradáveis durante estes dois anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pelo apoio financeiro cedido ao projeto através do Programa Pró-Pesquisa, do Programa de Bolsas Mestrado e Doutorado e do Auxílio Dissertação.

À Josenéia, pelo interesse e gentileza de revisar esta dissertação.

Às também biomédicas, Camila Farias e Camila Leal, amigas com quem compartilho minhas alegrias e conquistas desde a época da faculdade.

A Raphael, meu companheiro amado, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando em todos os momentos.

Ao meu pai, Joseilton, que é a razão de todo o meu esforço e dedicação para tudo nesta vida.

PEREIRA, Danielle Pessoa. Análise da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em carcinoma papilífero de tireoide. 159 f. il. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## RESUMO

**Introdução:** A oncogênese tireoidiana frequentemente envolve a ativação constitutiva da via RAS-RAF-MEK-ERK. A mutação BRAF<sup>V600E</sup> contribui para a sua ativação e tem sido considerada o evento oncogênico mais frequente do carcinoma papilífero de tireoide (CPT). Estudos clínicos e experimentais têm predominantemente demonstrado associação positiva entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e mau prognóstico do CPT. No entanto, alguns estudos não constataram esta associação, indicando que ainda há discrepâncias e variabilidade nos resultados obtidos. **Objetivos:** Determinar a prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em casos consecutivos de CPT em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital São Rafael, Salvador-Bahia-Brasil e associar a presença da mutação com aspectos clinicopatológicos conhecidos do CPT e risco de recorrência segundo protocolos do Consenso Brasileiro e a *American Thyroid Association*. **Metodologia:** Estudo retrospectivo de 135 casos consecutivos de CPT. Extração de DNA de tecido tumoral parafinado. Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento direto do exon 15 do gene *BRAF*. Dados clínicos e patológicos foram obtidos através da revisão de prontuários físicos e eletrônicos. A positividade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi confrontada com os aspectos clinicopatológicos dos pacientes utilizando Teste de Qui-Quadrado e análise multivariada de regressão logística. **Resultados:** A prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi de 65,1% (28/43). A mutação BRAF<sup>V600E</sup> esteve positivamente associada com idade avançada ( $40,96 \pm 13,69$  vs  $29,73 \pm 10,18$ ;  $P = 0,008$ ) e negativamente com presença de tireoidite de Hashimoto (TH) (25% vs 66,7%;  $P = 0,008$ ). Contudo, o efeito independente foi somente observado para TH (OR: 0,14;  $P = 0,024$ ). Neste estudo, não foram observadas associações com o sexo do paciente, história familiar, subtipo histológico, tamanho tumoral, multifocalidade, invasão vascular, metástases linfonodais e à distância, estágio clínico avançado (TNM/AJCC) e risco de recorrência tumoral. **Conclusão:** A prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi semelhante à apresentada em estudos prévios. A mutação BRAF<sup>V600E</sup> não esteve associada com a maioria dos aspectos clinicopatológicos investigados. Tireoidite de Hashimoto esteve negativamente associado com a mutação BRAF<sup>V600E</sup>.

**Palavras-chave:** câncer de tireoide; carcinoma papilífero de tireoide; mutação BRAF<sup>V600E</sup>

PEREIRA, Danielle Pessôa. BRAF<sup>V600E</sup> mutation analysis in papillary thyroid carcinoma. 159 pp. ill. 2014. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

**Background:** Thyroid oncogenesis often involves constitutive activation of the RAS-RAF-MEK-ERK pathway. BRAF<sup>V600E</sup> mutation contributes to this activation and has been considered the most frequent oncogenic event in papillary thyroid carcinoma (PTC). Clinical and experimental studies have predominantly demonstrated positive association between presence of BRAF<sup>V600E</sup> mutation and poor PTC prognosis. However, some studies have not found this association, so there still are discrepancies and variability in the results obtained. **Objectives:** To determine the BRAF<sup>V600E</sup> mutation prevalence in consecutive cases of PTC in patients diagnosed and treated at São Rafael's Hospital, Salvador-Bahia-Brazil, and associate its presence with known clinicopathological aspects of PTC and recurrence risk according to Brazilian's Consensus and American Thyroid Association guidelines. **Methods:** Retrospective study of 135 consecutive cases of PTC. DNA extraction from paraffin-embedded tumor tissue. Polymerase chain reaction and direct sequencing of exon 15 of *BRAF* gene. Clinical and pathological data were obtained through review of physical and electronic records. BRAF<sup>V600E</sup> mutation positivity was confronted with the clinicopathological features of patients using chi-square test and multivariate logistic regression analysis. **Results:** BRAF<sup>V600E</sup> mutation prevalence was 65.1% (28/43). BRAF<sup>V600E</sup> mutation was positively associated with older age ( $40.96 \pm 13.69$  vs  $29.73 \pm 10.18$ ,  $P = 0.008$ ) and negatively with the presence of Hashimoto's thyroiditis (HT) (25% vs 66.7%;  $P = 0.008$ ). However, the independent effect was only observed for HT (OR: 0.14,  $P = 0.024$ ). In this study, associations with patient gender, familial history, histologic subtype, tumor size, multifocality, vascular invasion, lymph node and distant metastases, advanced clinical stage (TNM/AJCC) and risk of tumor recurrence were not observed. **Conclusion:** BRAF<sup>V600E</sup> mutation prevalence was similar to the presented in previous studies. BRAF<sup>V600E</sup> mutation was not associated with most clinicopathological aspects investigated. Hashimoto's thyroiditis was negatively associated with BRAF<sup>V600E</sup> mutation.

**Keywords:** thyroid cancer; papillary thyroid carcinoma; BRAF<sup>V600E</sup> mutation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Gráfico das taxas de incidência e mortalidade do câncer de tireoide nos Estados Unidos entre os anos de 1975 e 2010.....	19
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática da progressão e desdiferenciação dos tumores derivados de células foliculares tireoidianas.....	23
<b>Figura 3</b>	Gráfico da incidência do câncer de tireoide e de seus tipos histológicos mais frequentes a partir de dados do programa SEER..	24
<b>Figura 4</b>	Gráfico das taxas de incidência do câncer de tireoide reportadas nos Estados Unidos entre 2006-2010, ajustadas por idade e sexo....	27
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática da via RAS-RAF-MEK-ERK.....	37
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da estrutura linear das RAF cinases....	39
<b>Figura 7</b>	Início da ativação da proteína B-RAF: recrutamento à membrana celular pela RAS-GTPase e exposição de sítios catalíticos.....	40
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática da estrutura primária da proteína B-RAF, destacando a troca de uma valina por um ácido glutâmico no resíduo 600 (BRAF <sup>V600E</sup> ).....	41
<b>Figura 9</b>	Tecido tireoidiano de pacientes tireoidectomizados no Hospital São Rafael.....	50
<b>Figura 10</b>	Demarcação manual da área tumoral a partir de corte de tecido tireoidiano corado com hematoxilina-eosina.....	53
<b>Figura 11</b>	Sequências dos <i>primers sense</i> e <i>antisense</i> selecionadas para amplificação do exon 15 do gene <i>BRAF</i> .....	54
<b>Figura 12</b>	Visualização das bandas amplificadas de nove amostras após PCR.....	55
<b>Figura 13</b>	Eletroferogramas apresentam trechos de sequenciamentos de <i>amplicons</i> .....	56
<b>Figura 14</b>	Fluxograma da seleção do grupo amostral.....	58
<b>Figura 15</b>	Perfil eletroforético de DNA extraído a partir de tecido parafinado (5-14) em comparação ao DNA extraído a partir de tecido fresco (1-4) previamente armazenado no LET/ICS.....	59
<b>Figura 16</b>	Visualização por microscopia óptica das variantes raras e CPT clássico BRAF <sup>V600E</sup> positivos.....	67



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Pacientes com estágio clínico avançado (III/IV) e/ou com risco intermediário ou alto de recorrência tumoral.....	63
-----------------	--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2014 entre homens e mulheres pelo INCA.....	20
<b>Tabela 2</b>	Alterações nas taxas de incidência do câncer por tipo ou sítio neoplásico primário de acordo com dados do programa SEER.....	21
<b>Tabela 3</b>	Categorização diagnóstica das punções citológicas recomendados pelo sistema Bethesda e os riscos de malignidade implicado para cada categoria.....	29
<b>Tabela 4</b>	Subtipos histológicos do carcinoma papilífero e suas respectivas prevalências.....	30
<b>Tabela 5</b>	Prevalência da mutação BRAF <sup>V600E</sup> em diferentes neoplasias tireoidianas, obtida por estudos contemporâneos à primeira constatação da presença da mutação em carcinoma papilífero de tireoide.....	43
<b>Tabela 6</b>	Características gerais dos pacientes incluídos no estudo.....	60
<b>Tabela 7</b>	Associação entre a mutação BRAF <sup>V600E</sup> e aspectos clinicopatológicos dos pacientes do estudo.....	65
<b>Tabela 8</b>	Análises univariada e multivariada da associação da mutação BRAF <sup>V600E</sup> com aspectos clinicopatológicos do CPT.....	69

## LISTA DE SIGLAS

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Comission on Cancer</i>
<b>ATA</b>	<i>American Thyroid Association</i>
<b>BRAF</b>	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
<b>CAT</b>	Carcinoma anaplásico de tireoide
<b>CDT</b>	Carcinoma diferenciado de tireoide
<b>CFT</b>	Carcinoma folicular de tireoide
<b>CMT</b>	Carcinoma medular de tireoide
<b>CPT</b>	Carcinoma papilífero de tireoide
<b>CR</b>	Região conservada ( <i>conserved region</i> )
<b>CRD</b>	<i>Cistein-rich domain</i>
<b>EET</b>	Extensão extratireoidiana
<b>ERK</b>	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
<b>ETA</b>	<i>European Thyroid Association</i>
<b>HSR</b>	Hospital São Rafael
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MCL</b>	Microdissecção de captura à <i>laser</i>
<b>MEK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<b>NIS</b>	Simportador de sódio-iodeto ( <i>sodium-iodine symporter</i> )
<b>PAAF</b>	Punção aspirativa por agulha fina
<b>PCI</b>	Pesquisa de corpo inteiro
<b>RAF</b>	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
<b>RBD</b>	<i>RAS-binding domain</i>

<b>SAPC</b>	Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia
<b>SBEM</b>	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
<b>SCCP</b>	Serviço de Cirurgia Cabeça e Pescoço
<b>SEER</b>	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
<b>SMN</b>	Serviço de Medicina Nuclear
<b>Tg</b>	Tireoglobulina
<b>TH</b>	Tireoidite de Hashimoto
<b>TNM</b>	<i>Tumor, Node, Metastasis</i> (sistema de estadiamento tumoral)
<b>TPO</b>	Tireoperoxidase
<b>TSH</b>	Hormônio tireoestimulante
<b>USG</b>	Ultrassonografia
<b>WGA</b>	Amplificação de genoma inteiro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1	CÂNCER DE TIREOIDE.....	18
2.1.1	<b>Epidemiologia</b> .....	18
2.1.2	<b>Classificação geral dos tumores tireoidianos</b> .....	22
2.2	CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE.....	23
2.2.1	<b>Aspectos clinicopatológicos</b> .....	23
2.2.2	<b>Patogênese molecular</b> .....	35
2.3	BRAF.....	38
2.3.1	<b>Estrutura e mecanismos regulatórios</b> .....	38
2.3.2	<b>BRAF e carcinoma papilífero de tireoide</b> .....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
3.1	GERAL.....	46
3.2	ESPECÍFICO.....	46
<b>4</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	47
4.1	NULA.....	47
4.2	ALTERNATIVA.....	47
<b>5</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	48
<b>6</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
6.1	DESENHO DE ESTUDO.....	49
6.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	49
6.3	CÁLCULO AMOSTRAL.....	49
6.4	GRUPO AMOSTRAL.....	50
6.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	51
6.6	REVISÃO DE PRONTUÁRIOS.....	51
6.7	AMOSTRAS TUMORAIS.....	52
6.8	ANÁLISE DA MUTAÇÃO BRAF <sup>V600E</sup> .....	53
6.8.1	<b>Extração do DNA genômico</b> .....	53
6.8.2	<b>Reação em cadeia da polimerase</b> .....	53
6.8.3	<b>Eletroforese em gel de agarose</b> .....	54
6.8.4	<b>Sequenciamento direto</b> .....	56
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
6.10	ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS.....	57
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	58
7.1	SELEÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL.....	58
7.2	DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS GERAIS.....	59
7.3	MUTAÇÃO BRAF <sup>V600E</sup> E ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS.....	65
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	70
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	92

<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE A – ESTADIAMENTO TUMORAL DE CARCINOMAS BEM DIFERENCIADOS DA TIREOIDE BASEADO NA 7º EDIÇÃO DO SISTEMA TNMA/AJCC.....</b>	<b>137</b>
	<b>APÊNDICE B – DESENHOS DE ESTUDO, CASUÍSTICAS E METODOLOGIAS APLICADAS POR DIFERENTES ESTUDOS QUE INVESTIGARAM A ASSOCIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF<sup>V600E</sup> E ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS DO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE.....</b>	<b>138</b>
	<b>APÊNDICE C – RESULTADOS OBTIDOS DE ESTUDOS QUE INVESTIGARAM A ASSOCIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF<sup>V600E</sup> E ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS DO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE.....</b>	<b>139</b>
	<b>APÊNDICE D – PROTOCOLO DE REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS.....</b>	<b>140</b>
	<b>ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICO EM PESQUISA DA ESCOLA DE ENFERMAGEM DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.....</b>	<b>142</b>
	<b>ANEXO B – APROVAÇÃO DA DIRETORIA MÉDIA DO HOSPITAL SÃO RAFAEL.....</b>	<b>145</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da taxa de prevalência baixa em relação a outros tipos de tumores malignos, o câncer diferenciado de tireoide (CDT) representa a neoplasia endócrina mais frequente em humanos (SHERMAN, 2003). Não obstante, a epidemiologia da doença tem demonstrado aumento expressivo em sua taxa de incidência nas últimas décadas (KILFOY et al, 2009; FERLAY et al, 2010). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que ao final de 2014 haverá o diagnóstico de 9.200 casos novos de CDT, com risco estimado de 8 casos para cada 100.000 mulheres (BRASIL, 2014).

Os tumores malignos da tireoide classicamente se originam a partir de dois tipos celulares: das células foliculares, derivando os carcinomas bem diferenciados; pouco diferenciados e indiferenciados; e das células parafoliculares, que dão origem ao carcinoma medular. Os carcinomas bem diferenciados compreendem as neoplasias tireoidianas mais frequentes e englobam o carcinoma papilífero e o carcinoma folicular da tireoide (SHERMAN, 2003; FAQUIN, 2008). O carcinoma papilífero da tireoide (CPT) representa o tipo histológico mais frequente, compreendendo mais de 85% das neoplasias malignas que acometem a tireoide (NIKIFOROV, 2012; DAVIES, L.; WELCH, 2014). De fato, a grande incidência atual do CDT deve-se sobretudo ao aumento do número de casos de CPT, particularmente microcarcinomas papilíferos (PELLEGRITI et al, 2013).

No geral, o CPT representa um tumor tipicamente indolente que apresenta prognóstico clínico relativamente mais favorável quando comparado a outros tipos de tumores malignos tireoidianos (GIMM, 2001; SHERMAN, 2003). O tratamento inicial padrão, que consiste na indicação de tireoidectomia total e ablação com radioiodo para casos selecionados, é eficaz principalmente quando o diagnóstico é precoce (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). No entanto, apesar da baixa taxa de mortalidade por CPT, alguns casos podem apresentar extensão extratireoidiana (EET) e metástases locais ou à distância, podendo progredir para estágios inoperáveis e não responsivos ao radioiodo. A recorrência geral do CPT ainda é considerada alta, podendo atingir 15 a 30% dos casos em 5-20 anos de *follow-up* (MAZZAFERRI; JHIANG, 1994; HAYAT et al, 2007; SHEN et al, 2010; CONZO et al, 2013; KIM, S. J. et al, 2014). Sendo assim, um dos mais relevantes focos de pesquisa clínica atual é a prevenção e a redução de recorrências.

A fim de reduzir a taxa de recorrência, bem como a mortalidade, por CDT, as principais sociedades científicas da área de Endocrinologia do mundo criaram *guidelines* que permitem orientar o manejo clínico dos pacientes diagnosticados (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Atualmente, a estratificação de risco de recorrência é a principal ferramenta para a determinação da melhor conduta terapêutica, sendo geralmente baseada em critérios clinicopatológicos. De fato, estudos clínicos têm demonstrado que uma variedade de aspectos clinicopatológicos podem influenciar o prognóstico do CPT, tais como idade ao diagnóstico, sexo, tamanho tumoral, EET, metástases locais ou à distância (HAMZANY et al, 2012; JONKLAAS et al, 2012; ITO et al, 2014). Além disso, algumas variantes histológicas do CPT possuem reconhecida maior agressividade, tais como a variante de células altas, variante de células colunares e variante esclerosante difusa (SILVER et al, 2011). Apesar da comprovada associação destes aspectos prognósticos com o aumento do risco de doença agressiva, estes não são suficientemente precisos e, em sua maioria, são reconhecidas após o tratamento cirúrgico inicial. Isto dificulta o manejo clínico adequado dos pacientes, sobretudo na decisão entre condutas terapêuticas menos ou mais agressivas. Desta forma, a biologia molecular tem apontado direções inovadoras que prometem otimizar o manejo do CDT.

Nos últimos anos houve grande avanço no entendimento dos eventos oncogênicos responsáveis pelo início e progressão do CDT. Em relação à patogênese molecular do CPT, ganharam destaque as alterações genéticas da via de sinalização da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), compreendendo mutações pontuais nos genes *BRAF* (*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) e *RAS* (*rat sarcoma*), e rearranjos cromossômicos no oncogene *RET* (*rearranged during transfection*) (GRECO et al, 2009; BHAIJEE; NIKIFOROV, 2011). As alterações mais prevalentes atingem o gene *BRAF*, sendo identificadas em 40-45% dos casos (KIMURA et al, 2003, OLER; CERUTTI, 2009). A proteína BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) possui atividade serina-treonina quinase e pertence à família RAF (DHILLON et al, 2007). Mutações ativadoras do gene *BRAF* ocorrem em amplo espectro de tumores humanos, predominantemente melanoma, e com menos frequência em carcinoma intestinal e de ovário (DAVIES, H. et al, 2002).

Em 2003, foi descrito que a mutação BRAF<sup>T1799A</sup> (referido inicialmente como mutação no nucleotídeo 1796) seria a alteração genética mais predominante no CPT (KIMURA et al, 2003). A mutação BRAF<sup>T1799A</sup> promove a tradução de uma proteína BRAF cuja região quinase apresenta-se constitutivamente ativa, através da substituição de valina para ácido



glutâmico no aminoácido 600 (V600E). Esta alteração desencadeia a ativação da via de transdução de sinal da MAPK, potencializando a transformação maligna (XING et al, 2005). Estudos subsequentes confirmaram a alta prevalência da mutação BRAF<sup>T1799A</sup> em CPT, assim como o fato de que a mutação está presente quase que exclusivamente neste tipo histológico, não sendo observado em outros tipos de carcinomas bem diferenciados da tireoide (KIMURA et al, 2003; NIKIFOROVA et al, 2003; XING et al, 2005). Esta alta prevalência e especificidade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT sugere seu provável papel na oncogênese e patogênese tumoral, com a possibilidade de utilização como marcador molecular prognóstico útil do CPT (XING, 2007).

Em relação ao papel prognóstico da mutação BRAF<sup>V600E</sup>, uma série de estudos clínicos demonstraram associação entre a mutação e aspectos clinicopatológicos de prognóstico do CPT (NAMBA et al, 2003; NIKIFOROVA et al, 2003; TROVISO et al, 2005; XING et al, 2005; FUGAZZOLA et al, 2006; GRIFFITH et al, 2006). Estudos também apontam prevalência ainda mais elevada em subtipos histológicos mais agressivos, como a variante de células altas (SHERMAN, 2003; MACIEL; KIMURA; CERUTTI, 2005; HAYAT et al, 2007; MAZZAFERRI et al, 2007). Ainda, nos tumores de maior agressividade, como CPT pouco diferenciado e carcinoma anaplásico com focos de tumor papilífero, é relativamente comum encontrar a mutação BRAF<sup>V600E</sup>, sugerindo possível participação de BRAF no processo de progressão e na agressividade tumoral (MACIEL et al, 2005; CARLING; OCAL; UDELSMAN, 2007). Reforçando a ideia, o papel oncogênico da mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi reproduzido e investigado em modelo experimental, mostrando maior agressividade tumoral do CPT e indiferenciação celular com evolução para subtipo de carcinoma pouco diferenciado, de perfil ainda mais invasivo (GHOSSEIN; LIVOLSI, 2008; OLER; CERUTTI, 2009).

No entanto, ainda não há consenso em relação ao real papel biológico da mutação BRAF<sup>V600E</sup> como fator prognóstico tumoral. Uma série de estudos foi incapaz de constatar associação clínica significativa entre a presença da mutação e comportamento clínico do CPT (ITO et al, 2009; SHEU et al, 2009; AHN et al, 2012; GOUVEIA et al, 2013; BARBABO et al, 2014). Sobretudo, outras análises mais recentes não foram concordantes ao demonstrar associação da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com comportamento biológico de maior recorrência, progressão clínica e falha terapêutica em variantes agressivas do CPT, sugerindo, portanto, a possibilidade de simples relação indireta entre a presença da mutação e os subtipos histológicos mais agressivo (KIMURA et al, 2003; NIKIFOROVA et al, 2003; RIVERA et al, 2008; RICARTE-FILHO et al, 2009).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CÂNCER DE TIREOIDE

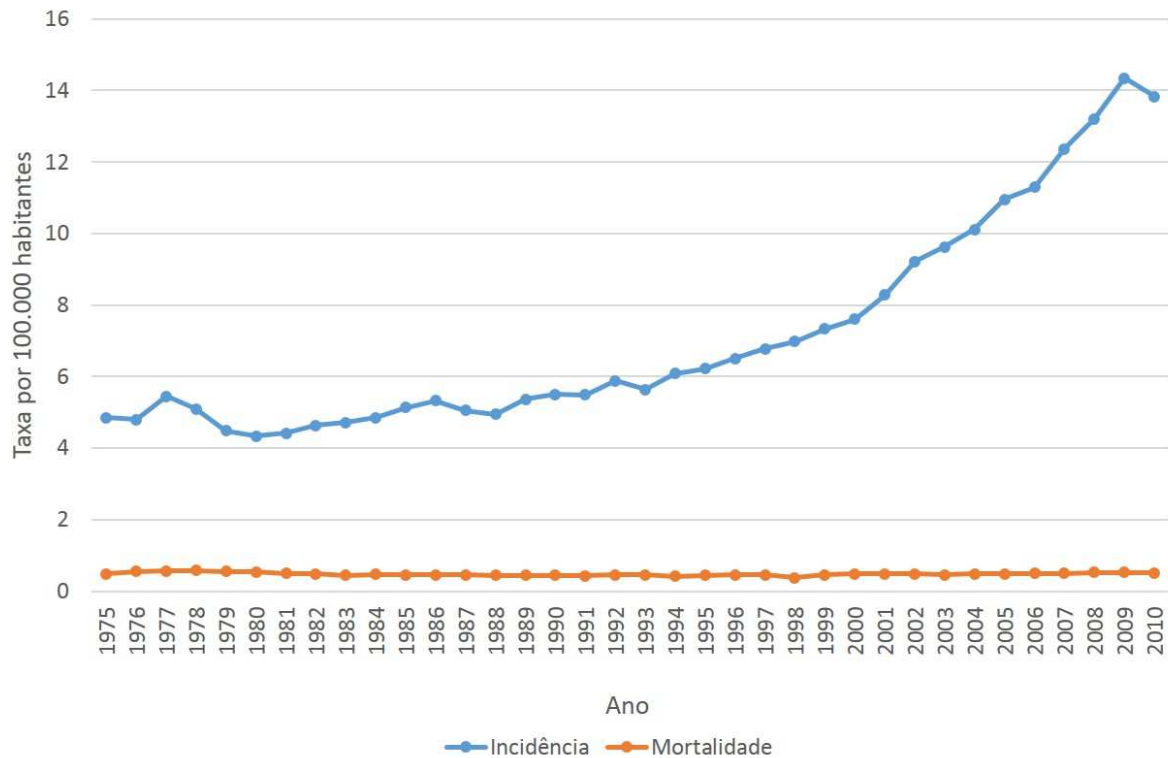
#### 2.1.1 Epidemiologia

Muito comum na prática clínica, o nódulo tireoidiano constitui a principal manifestação de grande parte das doenças tireoidianas. A prevalência do nódulo tireoidiano palpável na população é de 4 a 7% nas mulheres e 1% nos homens (MAZZAFERRI, 1992). Apesar da maioria dos casos representar lesões benignas (bócios, adenomas atóxicos e adenomas hiperfuncionantes ou tóxicos), a grande importância no manejo dos nódulos tireoidianos reside no fato de que 5 a 10% dos casos são neoplasias malignas (PAPINI et al, 2002; ROSARIO et al, 2013).

O câncer de tireoide representa a neoplasia endócrina mais comum, compreendendo 1% de todos os tipos de câncer diagnosticados em países ocidentais (SHERMAN, 2003). Apesar da sua relativa baixa prevalência em relação a outras neoplasias, houve nas últimas décadas aumento gradativo da incidência do câncer de tireoide na maior parte do mundo. Segundo os registros da série “Incidência do Câncer em Cinco Continentes” (*Cancer Incidence in Five Continents*), publicada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency of Research on Cancer*), o aumento da taxa de incidência do câncer de tireoide entre os anos de 1973 e 2002 foi reportado na maioria das populações estudadas de diferentes regiões geográficas (KILFOY et al, 2009; FERLAY et al, 2010). No Brasil, Veiga e colaboradores (2013) observaram que as taxas de incidência do câncer de tireoide na cidade São Paulo obtidas através Registro de Câncer de Base Populacional de São Paulo aumentaram 5,2% ao ano entre 1997 e 2008.

Dados do programa estadunidense Vigilância, Epidemiologia, e Resultados Finais (*Surveillance, Epidemiology, and End Results; SEER*) indicaram que o câncer de tireoide representa a neoplasia maligna de mais rápido crescimento nos últimos anos, atingindo taxa de 6,3% de incidência por ano (HOWLADER et al, 2014). A Figura 1 apresenta um gráfico que indica as taxas de incidência e mortalidade do câncer de tireoide obtidas a partir dos dados do programa, entre os anos de 1975 e 2010 (HOWLADER et al, 2014).


Figura 1: Gráfico das taxas de incidência e mortalidade do câncer de tireoide nos Estados Unidos entre os anos de 1975 e 2010.



Fonte: Elaborado pela autora. Dados do programa SEER (HOWLADER et al, 2014).

Apesar do gradual aumento da incidência, as taxas de mortalidade do câncer de tireoide mantiveram-se relativamente baixas e estáveis ao longo das últimas décadas em outros países desenvolvidos (BURGESS, 2002; FERLAY et al, 2013; JUNG et al, 2013; SHAW; SEMENCIW; MERY, 2014). No Brasil, Coeli e colaboradores realizaram um estudo epidemiológico no qual analisou dados provenientes do Sistema de Informações sobre Mortalidade, disponíveis no DATASUS do Ministério da Saúde ([www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)), e dos Registros de Câncer de Base Populacional, que indicaram inclusive redução dos índices de mortalidade por câncer de tireoide no país ao longo das últimas décadas (COELI et al, 2005). Este achado está em conformidade com estudo epidemiológico mais recente, que apontou diminuição da taxa de mortalidade por câncer de tireoide na cidade de São Paulo entre 1997 e 2008, de 0,53 a 0,37 (VEIGA et al, 2013). Apesar da redução da mortalidade reportada no país, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) já estima que ao final do ano de 2014 haverá incidência aproximada de 8 casos de câncer de tireoide para cada 100.000 mulheres (Tabela 1), levando a doença a ocupar a quinta posição de câncer mais incidente entre as mulheres no Brasil (BRASIL, 2014).

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2014 entre homens e mulheres pelo INCA.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Côlon e Reto	17.530	6,4%
Côlon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: BRASIL (2014, p. 55).

O aumento significativo da incidência do CDT no mundo pode estar relacionado ao aumento da sensibilidade de técnicas diagnósticas e exames de imagem que permitem a detecção de tumores pequenos e subclínicos (KENT et al, 2007; MORRIS et al, 2013; YOO et al, 2013; DAVIES, L.; WELCH, 2014). Contudo, alguns estudos e especialistas da área de Endocrinologia argumentam que houve aumento real da incidência do CDT, onde possivelmente existem outros fatores contribuintes além da detecção aprimorada da doença (LI, N. et al, 2013; PELLEGRITI et al, 2013; VEIGA et al, 2013). Quando assumido que a detecção precoce e melhor monitoramento são as únicas causas do aumento da incidência do CDT, o aumento do número de microcarcinomas (tumores < 1 centímetro) deveria também ser acompanhado do declínio da incidência de tumores grandes e mais avançados, o que não foi observado em alguns países industrializados (CHEN, A. Y.; JEMAL; WARD, 2009; ENEWOLD et al, 2009; REGO-IRAETA et al, 2009; HUGHES et al, 2011; SIMARD et al, 2012). Embora também possam ser admitidas diferenças na intensidade do rastreamento de doenças neoplásicas de acordo com a idade e sexo do indivíduo, Zhu e colaboradores (2009) constataram que a razão de incidência do CDT do sexo feminino para o masculino variou entre 2,01 a 3,07 durante o período entre 1973-2004, de acordo com os dados do programa SEER. Quando avaliado o efeito de coortes de nascimento ajustados por sexo, as gerações mais recentes apresentaram maior incidência da doença, sugerindo possíveis alterações na exposição a fatores de risco que propiciam o desenvolvimento do CDT (ZHU et al, 2009). Quando avaliada a população da cidade de São Paulo, Veiga e colaboradores (2013) constataram que a razão de incidência do sexo feminino para o masculino, entre 1997 e 2008, foi maior quando comparada à razão apresentada pelos dados do programa SEER (4,17 vs 3,10, respectivamente). Além

disso, as taxas de incidência do CDT aumentaram significativamente entre os indivíduos com idade inferior a 50 anos, tanto em mulheres quanto em homens (6,5% e 7,5%, respectivamente;  $P = \leq 0,05$ ), em contraste aos achados do programa SEER, que constatou maior aumento entre os indivíduos com idade superior a 50 anos (VEIGA et al, 2013). O contraste dos achados observados entre as duas regiões geográficas e étnicas podem sugerir que fatores externos distintos podem estar incidindo sobre estas populações. Além disso, cabe destacar que o impacto da evolução e da adesão dos exames diagnósticos deveria também compreender o aumento da detecção de maior variedade de neoplasias, cujas taxas de incidência não sofreram aumentos rápidos e significativos nas últimas décadas tanto quanto a observada, por exemplo, em CDT (Tabela 2) (PELLEGRITI et al, 2013; HOWLADER et al, 2014).

Tabela 2 – Alterações nas taxas de incidência do câncer por tipo ou sítio neoplásico primário de acordo com dados do programa SEER.

<b>Tipo ou Sítio neoplásico primário</b>	<b>Casos por 100.000 habitantes</b>		
	<b>1975</b>	<b>2011</b>	<b>Alteração (%)</b>
Fígado e ducto biliar intrahepático	2,64	8,35	(+) 216,28
<b>Tireoide</b>	<b>4,85</b>	<b>14,71</b>	<b>(+) 203,29</b>
Melanoma	7,89	22,74	(+) 188,21
Sarcoma de Kaposi	0,23	0,64	(+) 178,26
Rim e pelve renal	7,08	15,28	(+) 115,82
Linfoma não Hodgkin	11,07	19,63	(+) 77,32
Testículo	3,73	5,88	(+) 57,64
Mesotelioma	0,63	0,95	(+) 50,79
Próstata	94	139,89	(+) 48,82
Mieloma	4,9	6,67	(+) 36,12
Mama	105,07	129,56	(+)23,30
Sistema nervoso	5,85	6,47	(+)10,59
Esôfago	4,14	4,45	(+)7,48
Leucemia	12,8	13,66	(+) 6,71
Pulmão e brônquio	52,24	55,5	(+) 6,24
Bexiga urinária	19,32	20,13	(+) 4,19
Pâncreas	11,84	12,3	(+) 3,88
Linfoma Hodgkin	3,09	2,71	(-) 12,29
Cavidade oral e faringe	13,21	11,18	(-) 15,36
Corpo do útero	35,47	27,05	(-) 23,73
Ovário	16,32	12,09	(-) 25,92
Cólon e reto	59,53	39,3	(-) 33,98

**Continuação na próxima página**

Tabela 2 – Alterações nas taxas de incidência do câncer por tipo ou sítio neoplásico primário de acordo com dados do programa SEER (Continuação).

<b>Casos por 100.000 habitantes</b>			
<b>Tipo ou Sítio neoplásico primário</b>	<b>1975</b>	<b>2011</b>	<b>Alteração (%)</b>
Estômago	11,67	7,17	(-) 38,56
Laringe	5,02	2,93	(-) 41,63
Colo de útero	14,79	6,73	(-) 54,49

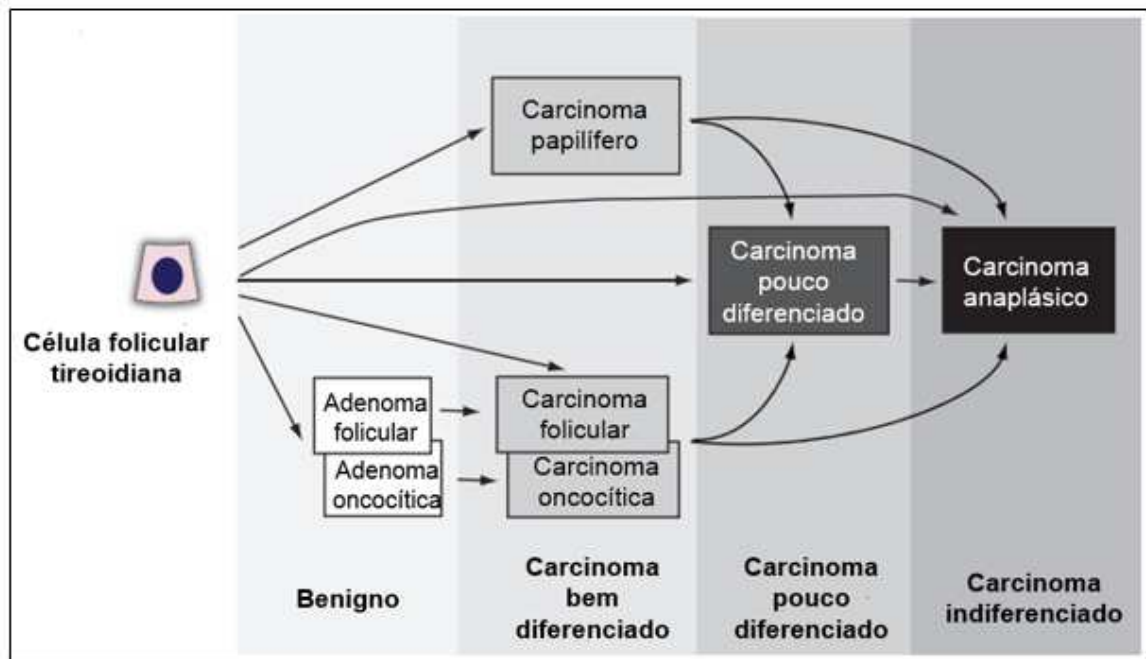
Fonte: Elaborado pela autora. Dados do programa SEER (HOWLADER et al, 2014).

### 2.1.2 Classificação geral dos tumores tireoidianos

Os tumores malignos da tireoide são classificados por tipos e subtipos histológicos que possuem histogênese, características e prognósticos distintos. Segundo a categorização atual estabelecida pela Organização Mundial de Saúde, os tumores tireoidianos são divididos em tumores primários e secundários, estes representando uma categoria incomum de metástases para a tireoide originárias de outros tumores (DELELLIS et al, 2004; NIKIFOROV, 2012). A maioria dos tumores tireoidianos primários possuem origem epitelial, enquanto que as neoplasias não-epiteliais são consideradas eventos raros (SNIEZEK; HOLTEL, 2003; BALOCH; LIVOLSI, 2008). Classicamente os tumores epiteliais da tireoide podem se originar a partir de dois tipos celulares: das células foliculares, que abrangem tanto lesões benignas (adenoma folicular) quanto lesões malignas (carcinomas bem diferenciados; pouco diferenciados e indiferenciados); e células C (carcinoma medular de tireoide; CMT) (NIKIFOROV, 2012). Os tumores malignos derivados das células foliculares compreendem as neoplasias tireoidianas mais frequentes (SHERMAN, 2003; FAQUIN, 2008).

O CDT é o mais predominante e enquadra CPT e o carcinoma folicular da tireoide (CFT). Existe questionamento quanto à possibilidade do CFT surgir a partir da transformação maligna de adenomas pré-existentes ou *de novo*, ignorando uma fase de pré-malignidade. Quanto aos carcinomas pouco diferenciados (CPDT) e carcinomas indiferenciados (carcinoma anaplásico de tireoide; CAT), acredita-se que ambos podem surgir tanto *de novo* quanto a partir da desdiferenciação de CDT (Figura 2) (NIKIFOROV, 2012).

Figura 2 – Representação esquemática da progressão e desdiferenciação dos tumores derivados de células foliculares tireoidianas.



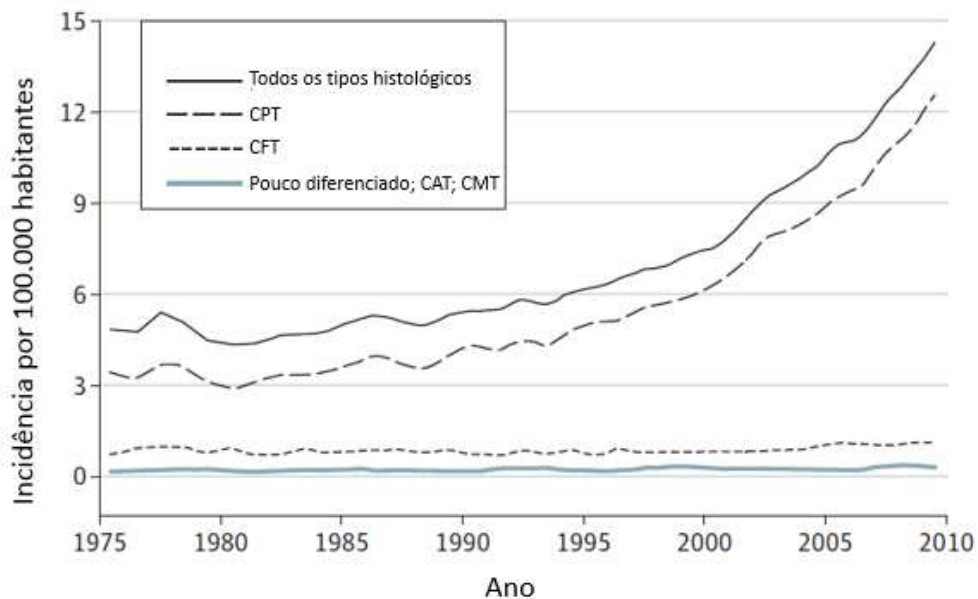
Fonte: adaptado de Nikiforov (2012, p. 110).

## 2.2 CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE

### 2.2.1 Aspectos clinicopatológicos

O CPT representa o tipo histológico mais frequente do CDT, compreendendo mais de 85% das neoplasias que acometem a glândula (DAVIES, L.; WELCH, 2014). A epidemiologia do câncer de tireoide tem demonstrado que o aumento da incidência da doença está associado quase exclusivamente ao diagnóstico de CPT, não afetando significativamente as taxas de incidência de outros tipos histológicos da doença (Figura 3) (TRIMBOLI et al; 2006; ALBORES-SAAVEDRA, et al, 2007; ENEWOLD et al, 2009; ASCHEBROOK-KILFOY et al, 2013; PATHAK et al, 2013).

Figura 3 – Gráfico da incidência do câncer de tireoide e de seus tipos histológicos mais frequentes a partir de dados do programa SEER.



Fonte: Adaptado de Louise Davies e Welch (2014, p. 3).

Apesar de ainda não haver uma definição sobre a etiologia do CPT, algumas condições podem predispor um indivíduo a desenvolver a doença e, inclusive, contribuir para o aumento da sua incidência. Estudos epidemiológicos têm apontado que a interação de alguns fatores envolvidos com pré-disposição genética, meio ambiente e com o próprio metabolismo do organismo podem ser determinantes para o desenvolvimento dos tumores tireoidianos.

Apesar da maioria dos casos de CPT possuir origem esporádica (ITO et al, 2009b; NOSÉ, 2011), está bem estabelecido que história familiar de CDT é um fator de risco de malignidade reconhecido (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Estudos populacionais já demonstraram que o risco de CDT é maior em indivíduos que possuem parentes de primeiro grau acometidos (FRICH; GLATTRE; AKSLEN; 2001; CHARKES, 2006; GOMES et al, 2011; XU, L. et al, 2012). Alguns casos familiares de CPT estão associados à polipose adenomatosa familiar, uma forma de câncer hereditário caracterizado pela formação de adenomas colorretais (PLAIL et al, 1987; CETTA et al, 1998). Os tumores papilíferos de pacientes afetados pela síndrome muitas vezes exibem características histológicas distintas, com áreas de morfologia cribiforme e componentes de células fusiformes (HARACH; WILLIAMS; WILLIAMS, 1994; SORAVIA et al, 1999; DONNELLAN; BIGLER; WEIN,



2009). A polipose adenomatosa familiar envolve mutações germinativas inativadoras do gene supressor tumoral *APC* (*adenomatous polyposis coli*) (LEE, S. et al, 2004; UCHINO et al, 2006). Dados na literatura indicam que a oncogênese tireoidiana mediada por alterações no gene *APC* pode ocorrer através da ativação da  $\beta$ -catenina, um dos efetores da via de sinalização WNT (*wingless-type*) (XU, B. et al, 2003), como também pela interação do gene mutante com alterações nos genes *RET/PTC* e *p53* (SORAVIA et al, 1999).

A exposição prévia à radiação ionizante é também fator de risco para o desenvolvimento do CPT. A literatura expõe casos relacionados à radiação médica, proveniente de técnicas diagnósticas e tratamentos radioterápicos na região da cabeça e pescoço (JONG et al, 1991; JERECZEK-FOSSA et al, 2004), bem como após exposição à radiação proveniente de acidentes com armas nucleares e envolvendo reatores nucleares (TAKAHASHI et al, 2003; IMAIZUMI et al, 2006; NIKIFOROV, 2006). Em ambos os casos, o risco é mais proeminente quando a exposição ocorre durante a infância ou adolescência (RON et al, 1995; FURUKAWA et al, 2013).

Um fator de risco bastante discutido é a ingestão de iodo. Apesar da relevância do consumo de iodo para o desenvolvimento de CDT ainda permaneça indefinida, estudos experimentais demonstraram que animais submetidos à dieta restritiva prolongada de iodo obtiveram maior risco de desenvolver a doença em comparação ao grupo controle (FORTNER; GEORGE; STERNBERG, 1960; SCHALLER; STEVENSON, 1966). O desenvolvimento da doença foi associado ao aumento dos níveis do hormônio tireoestimulante (TSH), maior fator de crescimento das células foliculares tireoidianas, causado pela deficiência de iodo. No entanto, o aumento significativo do risco de CDT não foi observado em humanos residentes em áreas de deficiência de iodo (FELDT-RASMUSSEN, 2001). O que se observa é que em áreas de deficiência de iodo há maior incidência de CFT e CAT, enquanto em áreas de alto consumo de iodo a frequência de CPT é maior (FRANCESCHI, 1998; KNOBEL; MEDEIROS-NETO, 2007).

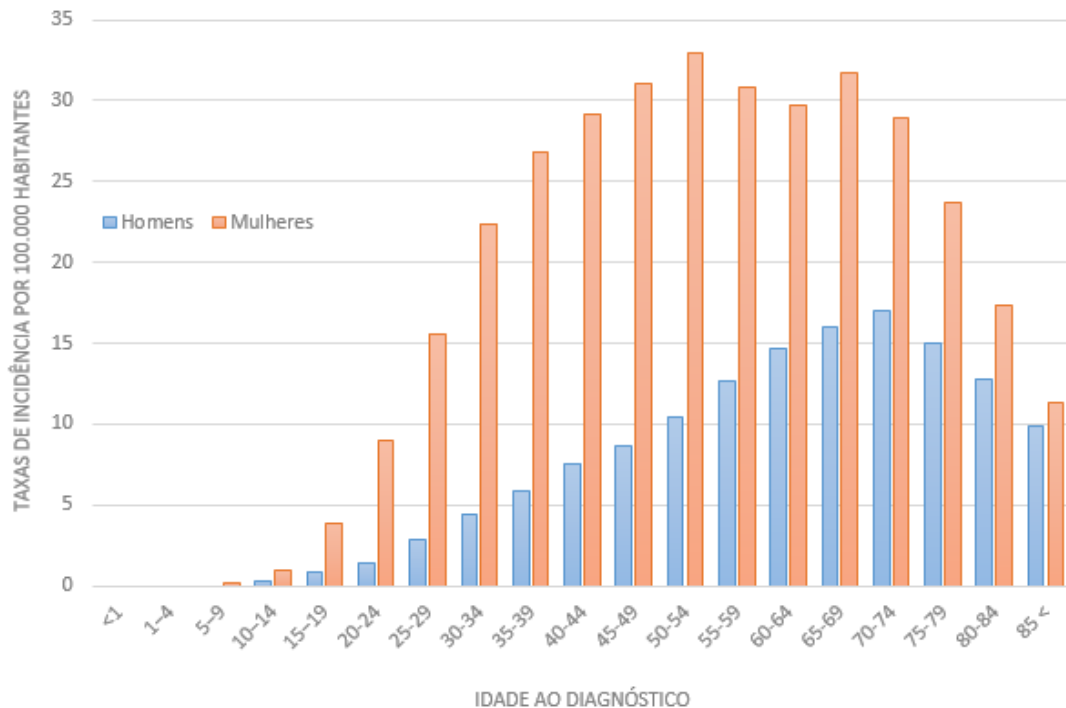
Sobrepeso e/ou obesidade têm sido associados ao desenvolvimento e progressão de diversos tipos de neoplasias (VIGNERI et al, 2006; WOLIN; CARSON; COLDITZ, 2010). Em relação ao CDT, recente meta-análise de estudos observacionais reportou associação entre excesso de peso e tumores tireoidianos (ZHAO et al, 2012). No entanto, os mecanismos patofisiológicos envolvidos nesta associação ainda permanecem incertos. Considerando que a obesidade trata-se de uma doença multifatorial, as causas da contribuição para a oncogênese tireoidiana têm sido discutidas na literatura. Em revisão recente, Marcello e colaboradores

(2014) destacaram a resistência à insulina como provável elemento etiopatogênico na associação entre a obesidade e CDT. Resistência à insulina se refere a uma condição onde a sensibilidade das células à ação da insulina está reduzida, de modo que as células  $\beta$  pancreáticas possam a produzir maiores níveis de insulina como mecanismo compensatório, culminando na hiperinsulinemia. Rezzónico e colaboradores (2009) observaram alta prevalência de resistência à insulina em pacientes com CDT quando comparado ao grupo controle (50% vs 10%;  $P = < 0,001$ ). Insulina participa da regulação da expressão gênica nas células tireoidianas, estimulando a diferenciação e a proliferação celular. Ativação dos receptores de insulina resulta na fosforilação e recrutamento de várias moléculas que ativam as vias de sinalização celular das MAPKs e do fosfatidilinositol-3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase*; PI3K), eventos geralmente envolvidos na proliferação e sobrevivência celular (GUO, 2014). Contudo, importa considerar o efeito da hiperinsulinemia sobre o aumento das taxas de incidências do câncer de tireoide também deveria ser observado em outros órgãos, cujas taxas de incidência de câncer não aumentaram de maneira significativa (como discutido no tópico 2.1.1).

Em relação aos fatores reprodutivos, importa destacar que a própria epidemiologia do câncer de tireoide tem demonstrado que a idade e sexo do indivíduo são fatores relacionados à predisposição à doença. A Figura 4 apresenta um gráfico das taxas de incidência do câncer de tireoide, ajustadas por idade e sexo, reportadas pelo programa SEER entre os anos de 2006 e 2010. Apesar da possibilidade de se manifestar em qualquer período da vida de um indivíduo, o CDT é considerado um evento raro durante a infância, especialmente antes dos 10 anos de idade (RIVKEES et al, 2011; VAISMAN; CORBO; VAISMAN, 2011). Vergamini e colaboradores (2014) observaram que houve aumento significativo na taxa de incidência de CDT em pacientes jovens entre 1984 e 2010, com taxas anuais de 3,44% e 3,81% em homens e mulheres, respectivamente, indicando que a tendência do aumento da incidência da doença também atingiu a população pediátrica. A taxa de incidência do CDT aumenta conforme a idade do indivíduo avança, alcançando um pico em torno da 5ª década de vida, e tende a diminuir a partir da faixa dos 70 anos de idade (DAVIES, L.; WELCH, 2014). Quanto ao sexo do indivíduo, o CDT apresenta distribuição equilibrada entre homens e mulheres durante a infância e a terceira idade. Contudo, após o período da puberdade, é observada predominância significativa da doença entre as mulheres. Dados do SEER constataram que, do período entre 1975 e 2010, as taxas anuais de incidência do CDT por 100.000 habitantes aumentaram de 2,39 a 7,01 em homens e de 6,15 a 21,43 em mulheres (HOWLADER et al, 2014). No Brasil, Veiga

e colaboradores (2013) observaram que de 1997 a 2008 as taxas de incidência da doença na cidade de São Paulo aumentaram de 14,80 a 23,11 em mulheres e de 3,64 a 5,49 em homens.

Figura 4 – Gráfico das taxas de incidência do câncer de tireoide reportadas nos Estados Unidos entre 2006-2010, ajustadas por idade e sexo.



Fonte: Elaborado pela autora. Dados do programa SEER (HOWLADER et al, 2014).

A predominância da doença no sexo feminino durante o período reprodutivo, corrobora o indício de que fatores hormonais femininos possam estar envolvidos na patogênese do CDT (MACK et al, 1999; CHAN et al, 2006; CHEN, G. G. et al, 2008). Apesar da contribuição do estrogênio para a oncogênese tireoidiana ainda não estar definida, diversos estudos buscaram elucidar o papel do estrogênio na iniciação e progressão do câncer de tireoide. Há evidências de que o estrogênio pode influenciar a proliferação celular através da indução da expressão de diversos proto-oncogenes, tais como *c-jun* (*v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog*), *c-myc* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) e *c-fos* (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), bem como de fatores de crescimento e ciclinas (SANTIN; FURLANETTO, 2011; RAJORIA et al, 2012). Dentre as respostas celulares mediadas pelo hormônio, cabe destacar que estudos demonstraram que a expressão e ativação

dos diferentes subtipos de receptores de estrogênio podem modular a patogênese da doença ao influenciarem a proliferação celular pela ativação de diversas vias de sinalização intracelular, assim como observado em câncer de mama (SOTOCA et al, 2008). A ligação do estrogênio ao receptor do tipo alfa (*estrogen receptor alpha*; ER $\alpha$ ) promoveria a proliferação e crescimento celular, e, em contraste, a ativação do ER tipo beta (ER $\beta$ ) promoveria ações apoptóticas e outras funções tumorais supressivas em culturas de células (CHO, M. A. et al, 2007; ZENG et al, 2007).

Atualmente, provavelmente devido a aperfeiçoamento do diagnóstico de tumores e da detecção precoce, a maioria dos pacientes acometidos pelo CPT apresenta nódulo tireoidiano assintomático de evolução indolente, diagnosticado incidentalmente por ultrassonografia (USG) e outros exames de imagem. No entanto, quando se tratam de nódulos palpáveis e aparentes, os pacientes podem se queixar de dor e apresentar sintomas sugestivos de compressão de estruturas cervicais, tais como disfagia, rouquidão, tosse, disfonia e estridor (NIKIFOROV; OHORI, 2012). Além disso, alguns casos de CPT podem se manifestar como nódulos tireoidianos associados a linfonodos metastáticos cervicais (WADA et al, 2003; KIM, B. Y. et al, 2012; MIZRACHI et al, 2014), e, mais raramente, estar clinicamente presentes apenas nos linfonodos cervicais (FLANAGAN et al, 2000; ANASTASILAKIS et al, 2012).

A USG cervical é o método diagnóstico de imagem amplamente utilizado na prática clínica para a avaliação de nódulos tireoidianos suspeitos (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). No entanto, uma vez que a maioria dos aspectos ultrassonográficos não são específicos para malignidade (BRITO et al, 2014), a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é recomendada, sobretudo diante de características nodulares suspeitas na USG e critérios clínicos estabelecidos pela maioria dos consensos (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Através da avaliação citológica, a PAAF é considerada o método que melhor permite a distinção entre lesões benignas e malignas, com até 95% de acurácia (MAMOON et al, 1997; MURUSSI et al, 2001; ABU-SALEM, 2003; WU; JONES; OSMAN, 2006; MENEGASSI; BORDIN). A elevada acurácia diagnóstica atribuída à PAAF diminuiu de forma significativa a taxa de tireoidectomias desnecessárias para pacientes com nódulos benignos, assim como passou a triar apropriadamente os pacientes elegíveis para o tratamento cirúrgico (SCHLUMBERGER; PACINI, 2006; YASSA et al, 2007). A fim de evitar interpretações ambíguas entre os médicos patologistas, endocrinologistas e cirurgiões, uma conferência realizada pelo *National Cancer Institute* (NCI) introduziu o sistema Bethesda

para a categorização diagnóstica das punções (Tabela 3) (CIBAS; ALI, 2009; RENUKA et al, 2012).

Tabela 3 – Categorização diagnóstica das punções citológicas recomendados pelo sistema Bethesda e os riscos de malignidade implicado para cada categoria.

<b>Categorias</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Risco de malignidade (%)</b>
<b>I</b>	Amostra não diagnóstica ou insatisfatória	1 a 4
<b>II</b>	Benigna	0 - 3
<b>III</b>	Atipias/Lesão folicular de carácter indeterminado	5 a 15
<b>IV</b>	Suspeita de neoplasia folicular ou neoplasia folicular	15 - 30
<b>V</b>	Suspeita de malignidade	60 - 75
<b>VI</b>	Maligna	97 - 99

Fonte: Adaptado de Cibas e Ali (2009, p. 3).

A despeito do tratamento inicial do CPT, o paciente que obtém diagnóstico positivo ou até mesmo suspeito de malignidade ao exame citopatológico é indicado para ser submetido ao tratamento cirúrgico, recomendação unânime entre os *guidelines* publicados até então (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Tal procedimento inclui a ressecção da glândula tireoide (parcial ou completa) e, em alguns casos, a retirada de linfonodos cervicais, com o objetivo de remover o tumor e possíveis metástases regionais. Logo após a cirurgia, os espécimes resultantes da ressecção cirúrgica são encaminhados para avaliação anatomopatológica, onde serão evidenciadas características macro e microscópicas que determinarão o diagnóstico de CPT e auxiliarão na determinação prognóstica. Ainda, a classificação de tumores tireoidianos elaborada pela Organização Mundial de Saúde reconhece uma subcategoria de variantes histológicas do CPT (Tabela 4) (DELLELIS et al, 2004). Os subtipos histológicos geralmente são distinguidos com base em características microscópicas particulares, ao passo que exibem características clínicas e prognósticos distintos (AL-BRAHIM; ASA. 2006; GONZALEZ-GONZALEZ et al, 2011; KHANAFSHAR; LLOYD, 2011). Portanto, além de permitir a impressão diagnóstica gerada após análise citopatológica, o exame anatomopatológico é de fundamental importância para a identificação de fatores histopatológicos prognósticos que, em conjunto com outros aspectos clínicos, auxiliam na determinação da estratégia terapêutica pós-cirurgia mais adequada.

Tabela 4 – Subtipos histológicos do carcinoma papilífero e suas respectivas prevalências.

<b>Variantes do carcinoma papilífero da tireoide</b>	<b>Prevalência</b>
▪ Microcarcinoma papilífero	30-40%
▪ Folicular	15-20%
▪ Células Altas	5-10%
▪ Sólida	1-3%
▪ Esclerosante difusa	1-2%
▪ <i>Hobnail</i>	<1%*
▪ Oncítica	<1%
▪ Células claras	<1%
▪ Células Colunares	<1%
▪ CPT com estroma tipo fascite	<1%
▪ CPT tipo <i>Warthin</i>	<1%
▪ Cribiforme Morular	<1%

Fonte: Elaborada pela autora. Prevalência baseada em estudo de Asioli e colaboradores (2013).

Após o tratamento cirúrgico inicial, alguns pacientes são submetidos à ablação ou tratamento com radioiodo, que pode prolongar a sobrevida do paciente através da eliminação de remanescentes tireoidianos, de focos microscópicos presentes em linfonodos e no leito tireoidiano e de possíveis metástases (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Esta conduta é beneficiada pela avidéz das células tireoidianas neoplásicas ao radioiodo, processo que requer expressão e função normais de genes responsáveis pelo metabolismo celular do iodo. O CPT geralmente apresenta prognóstico clínico favorável, sobretudo após terapêutica adequada (GIMM, 2001; SHERMAN, 2003). Segundo o programa SEER, a taxa de sobrevida em 10 anos equivale cerca de 96% (HOWLANDER et al, 2014). No entanto, alguns pacientes acometidos podem evoluir de forma desfavorável, apresentando tumores que expandem além da cápsula tireoidiana, bem como metástases locais e à distância, contribuindo de forma significativa para pior prognóstico (EUSTATIA-RUTTEN et al, 2006; HAMZANY et al, 2012; NIXON et al, 2012).

Diversas pesquisas de caráter epidemiológico, clínico e patológico têm focado na identificação de possíveis fatores que influenciam a evolução do CPT, de modo que possibilite a estratificação dos casos em um espectro de alto a baixo ou muito baixo risco, possibilitando

a definição de uma estratégia terapêutica otimizada de tratamento e seguimento. Uma variedade de sistemas de estratificação de risco foi publicada e os mesmos têm sido propostos para este fim, baseando-se particularmente na probabilidade de morte específica pela doença após o diagnóstico inicial. Na prática clínica, o sistema de classificação TNM (*Tumor, Node, Metastasis*), recomendada pela *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) (AJCC, 2010), é reconhecido como referência internacional para o estadiamento do câncer de tireoide (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Outros sistemas também se provaram úteis, tais como o AMES (*Age, distant Metastasis, Extent of disease, Size*) (CADY, 1998); AGES (*Age, tumor Grade, Extent of disease, Size*) (HAY et al, 1987); MACIS (*distant Metastases; Age, Completeness of surgery, Invasion of extrathyroidal tissues, Size*) (HAY et al, 1993); NTCTCS (*National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Classification*) (SHERMAN et al, 1998); OSU (*Ohio State University*) (MAZZAFERRI; JHIANG, 1994); EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) (BYAR et al, 1979); dentre outros. O Apêndice A apresenta as variáveis utilizadas pelo sistema TNM.

Os aspectos clinicopatológicos ponderados pelos sistemas são obtidos logo após o tratamento inicial e exame anatomopatológico, e, de modo geral, são parâmetros que não se alteram ao longo do tempo. Contudo, a depender do curso clínico da doença e a resposta à terapia adjuvante, o risco de doença agressiva pode alterar durante o *follow-up*. De fato, apesar de serem constantemente adotados na prática clínica, os sistemas de estadiamento tumoral disponíveis são limitados, não sendo inteiramente capazes de predizer o risco de recidiva tumoral, que pode ser o primeiro sinal de desfecho desfavorável. Esta condição é relevante sobretudo diante de casos considerados de baixo risco que apresentam doença agressiva durante o *follow-up* e conseqüente redução da sobrevida. Dessa forma, para manejo adequado do CPT, faz-se necessário uma reavaliação do risco de recorrência e mortalidade à medida que novos dados são obtidos durante o *follow-up* (TUTTLE; LEBOUF, 2008). Para tanto, novos sistemas de estratificação voltados para o risco de recorrência foram elaborados e publicados pela *American Thyroid Association* (ATA), *European Thyroid Association* (ETA) e, mais recentemente, pela Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), classificando os casos entre risco muito baixo e risco alto de recorrência ao incluir parâmetros como ressecção cirúrgica, subtipo histológico, resultado da pesquisa de corpo inteiro (PCI) e níveis séricos de tireoglobulina (Tg) (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013).

Tanto os sistemas de avaliação do risco de morte específica pela doença quanto os sistemas de avaliação de risco de recorrência se baseiam em análises univariadas e multivariadas que destacaram diversos fatores prognósticos para o CDT, inclusive para o CPT. Um dos indicadores prognósticos mais bem estabelecido, por exemplo, é a idade do paciente no momento do diagnóstico. Desde 1925 já haviam relatos da associação da idade com o prognóstico do câncer de tireoide (CRAVER, 1925). No entanto, o impacto deste indicador na história natural e prognóstico da doença somente passou a ser enfatizado décadas depois (CRILE; HAZARD, 1953). Atualmente, ainda que em outros tipos de câncer a idade avançada está geralmente associada a pior sobrevida (EAKER et al, 2006; ALI et al, 2011; WANG, J.; WANG, F. W., 2013), o CDT representa a única neoplasia onde a idade ao diagnóstico é amplamente utilizada na prática clínica como indicador prognóstico pela maioria dos sistemas de estadiamento. De fato, diversas evidências provenientes de estudos clínicos sustentam a adoção deste critério.

Apesar de que as circunstâncias que incidem sobre a disparidade prognóstica entre as faixas etárias ainda sejam incertas, já foi evidenciado que o tecido tireoidiano saudável difere entre as populações infantil e adulta (FAGGIANO et al, 2004). Além disso, o índice de proliferação da célula tireoidiana normal é maior durante a infância e apresenta níveis decrescentes com o avançar da idade (SAAD et al, 2006). Não obstante, o CPT pediátrico apresenta comportamento inicial mais agressivo quando comparado à população adulta, manifestando-se como tumores maiores, com alta incidência de multifocalidade, metástases linfonodais e distantes e recorrências (JARZAB; HANDKIEWICZ-JUNAK; WLOCH, 2005; DEMIDCHIK et al, 2006; MICCOLI et al, 2008; ITO et al, 2012; MOTAZEDIAN et al, 2013; PARK, S. et al, 2013). Apesar das características predominantemente agressivas, o CPT pediátrico apresenta prognóstico mais favorável, com taxas de sobrevida em 10 anos entre 77-99% (DEMIDCHIK et al, 2006; RIVKEES et al, 2011; VAISMAN; CORBO; VAISMAN, 2011; PARK, S. et al, 2013). O bom prognóstico e consequente baixa taxa de mortalidade também acompanha os pacientes adultos diagnosticados entre 22-45 anos de idade (RONGA et al, 2004; CHO et al, 2012; MAZURAT et al, 2013; YANG; SHEN; SAKAMOTO, 2013), exceto quanto à apresentação clínica, que geralmente é indolente. O efeito negativo da idade ao diagnóstico sobre o prognóstico do CPT aumenta gradualmente após esta etapa da vida, com o CPT manifestando-se como tumor agressivo localmente invasivo e elevada taxa de recorrência, principalmente a partir dos 60 anos (CHO et al, 2012; NIXON et al, 2012; OYER; SMITH; LENTSCH, 2012; AMPHLETT et al, 2013; MAZURAT et al, 2013; VERBURG et al, 2013).



Embora seja adotado por uma parcela das classificações prognósticas, o sexo do indivíduo acometido pelo CPT representa um indicador ainda controverso. Alguns estudos clínicos puderam observar que pacientes do sexo masculino tendem a apresentar tumores mais avançados e menores taxas de sobrevida em relação à população feminina (MICHELI et al, 2009; ITO et al, 2011; HSIEH et al, 2012; YANG; SHEN; SAKAMOTO, 2013; LIANG et al, 2014). No entanto, apesar de alguns também observarem maior frequência de casos agressivos entre a população masculina, outros estudos semelhantes não foram capazes de evidenciar efeito prognóstico independente sobre o CPT (ELISEI et al, 2010; NILUBOL; ZHANG; KEBEBEW, 2013).

Outro indicador prognóstico ainda discutido é a história familiar de câncer de tireoide. Baseado em relatos de variados estudos clínicos, ainda permanece controverso se o prognóstico de pacientes com história familiar de câncer de tireoide, particularmente de CDT, difere daqueles pacientes com doença esporádica. Os estudos que sugeriram papel mais agressivo para CDT familiar observaram maior frequência de multifocalidade, invasão vascular, metástases linfonodais e recorrências (CAPEZZONE et al, 2008; ITO et al, 2009; PITOIA et al, 2011; MAZEH et al, 2012; LEE, Y. M. et al, 2014). Além disso, alguns relatos indicaram que pacientes que possuíam três ou mais membros da família com CDT tinham menor sobrevida e, conseqüentemente, pior desfecho (ALSANEA et al, 2000; TRIPONEZ et al, 2006). Contudo, outros estudos não evidenciaram comportamento mais agressivo em pacientes com CDT familiar quando comparado aos casos esporádicos (MAXWELL; HALL; FREEMAN, 2004; ITO et al, 2008; ROBENSHTOK et al, 2011).

O tamanho tumoral representa um indicador prognóstico bastante reconhecido de CPT. Diversos estudos clínicos evidenciaram aumento gradual do risco de EET, metástase linfonodal, metástase à distância, recorrência e morte compatível com o tamanho do tumor primário (MACHENS; HOLZHAUSEN; DRALLE, 2005; NOGUCHI et al, 2008; KOO et al, 2009; VERBURG et al, 2009; KONTUREK et al, 2012; YANG; SHEN; SAKAMOTO, 2013). Contudo, apesar do excelente prognóstico geralmente apresentado pelos microcarcinomas, ainda não há consenso sobre o seu manejo, uma vez que esta condição não exclui a possibilidade de doença agressiva (NOGUCHI et al, 2008; ZHOU et al, 2012; MANTINAN et al, 2012; PIANA et al, 2013; CHÉREAU et al, 2014; GHOSSEIN et al, 2013).

Estimativas de frequência de tumores papilíferos multifocais variam na literatura, entre 18% a 87% (KATOH et al, 1992; SHATTUCK et al, 2005; SAKORAFAS et al, 2007; PAPAGEORGIOU et al, 2010; MAZEH et al, 2011). Estudos de clonalidade evidenciaram que

focos tumorais podem corresponder a múltiplos tumores primários ou a metástases intraglandulares (SHATTUCK et al, 2005; KUHN et al, 2012). Apesar deste aspecto vir sendo associado a maiores taxas de metástases linfonodais, invasão vascular e recorrência (ZHENG, X. Q. et al, 2012; KIM, H. J. et al, 2013), o impacto prognóstico independente da multifocalidade ainda não está elucidado (KUO et al, 2013), de modo que ainda não é adotado pela maioria dos sistemas de estadiamento prognósticos.

A literatura demonstra que o CPT que apresenta extensão além da cápsula tireoidiana geralmente está associado com doença agressiva, doença persistente e recorrente, mesmo em casos de extensão mínima (ITO et al, 2006; ARORA et al, 2008; CHERÉAU et al, 2014; CLAIN et al, 2014; KIM, W. Y. et al, 2014; RADOWSKY et al, 2014). Possivelmente a EET expõe o paciente a recorrências locais e metástases à distância e risco aumentado de morte (NIKIFOROV; OHORI, 2012), de modo que representa um parâmetro amplamente utilizado pelos sistemas de estadiamento disponíveis.

Metástases linfonodais representam o aspecto mais comum de propagação do CPT, muitas vezes presentes durante o diagnóstico inicial da doença. Apesar de não afetar a taxa de sobrevida diretamente, o acometimento dos linfonodos representa um fator prognóstico reconhecido pelo sistema TNM e pelos sistemas de avaliação de recorrência, sendo associados com aumento do risco de doença agressiva (BEASLEY et al, 2002; WADA et al, 2003; ITO et al, 2007; KIM, T. Y. et al, 2008; RYU et al, 2014). Em contraste com a frequente invasão linfática intraglandular, a invasão vascular também pode estar presente em CPT, estando associado com metástases e elevada taxa de recorrência tumoral (GARDNER et al, 2000; MAI et al, 2002; FALVO et al, 2005), de modo que é um parâmetro adotado pelos sistemas de estratificação de risco de recorrência vigentes (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). A propagação hematogênica propicia o desenvolvimento de metástases à distância, que acomete 2-5% dos tumores papilíferos (SCHLUMBERGER; PACINI, 2008; NIKIFOROV; OHORI, 2012) e resulta em pior prognóstico e aumento das taxas de mortalidade e recorrência (CLARK et al, 2005; HAQ; HARMER, 2005; NIXON et al, 2012).

Como já mencionado anteriormente, muitas variantes histológicas do CPT e seus respectivos comportamentos biológicos têm sido descritas na literatura e evidenciadas na prática clínica (AL-BRAHIM; ASA, 2006; LLOYD; BUELER; KHANAFSHAR, 2011). Estudos clínicos também relataram significância prognóstica em alguns subtipos histológicos, que são reconhecidos como variantes agressivas do CPT (DELLELIS et al, 2004). As variantes agressivas do CPT incluem: células altas; células colunares; esclerosante difusa; *hobnail* e

insular (GONZALEZ-GONZALEZ et al, 2011; SILVER et al, 2011; BALOCH; LIVOLSI; TONDON, 2013; ROMAN; SOSA, 2013). Dentre estes, a variante de células altas é a mais frequente, compreendendo 4-8% dos casos de CPT (MICHELS et al, 2007; KAZAURE; ROMAN; SOSA, 2012). Diversos estudos populacionais observaram que a histologia da variante de células altas esteve associada com características agressivas e de mau prognóstico, apresentando estágio clínico mais avançado, EET, além de altas taxas de metástases, recorrências e mortalidade (SYWAK; PASIEKA; OGILVIE, 2004; MICHELS et al, 2007; ITO et al, 2008b; LEUNG; CHOW; LAW, 2008; JALISI; AINSWORTH; LAVALLEY, 2010; MORRIS et al, 2010; KAZAURE; ROMAN; SOSA, 2012). As demais variantes agressivas citadas, apesar de raras, também exibem, com frequência, aspectos associados com agressividade tumoral (NIKIFOROV et al, 2001; SYWAK; PASIEKA; OGILVIE, 2004; FALVO et al, 2006; RUFINI et al, 2007; ASIOLI et al, 2013). Apesar das evidências associando estas variantes do CPT com aspectos clinicopatológicos de relevância prognóstica, alguns especialistas argumentam que o mau prognóstico atribuído às variantes agressivas do CPT está diretamente associado com outros fatores clinicopatológicos e até moleculares (WENIG et al, 1998; MICHELS et al, 2007; SILVER et al, 2011).

De fato, avanços consideráveis na área da Biologia Molecular do câncer ocorreram nas últimas décadas de modo que uma série de marcadores moleculares para o diagnóstico e prognóstico do CDT tem sido descritos e avaliados (BLANCO; MATUTE; HIDALGO, 2012; BALDINI et al, 2014). Uma vez que os principais sistemas de estratificação de risco do CDT ainda apresentam importantes limitações, a possível utilização de marcadores moleculares na prática clínica, aliados aos aspectos clinicopatológicos já estabelecidos, inspira expectativas para a melhoria do manejo da doença.

### **2.2.2 Patogênese molecular**

A oncogênese é um evento decorrente do acúmulo de alterações genéticas ou epigenéticas que perturbam a modulação de processos celulares fundamentais, tais como o crescimento, a proliferação, a diferenciação, a migração e a apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Naturalmente, estes processos são eventos fisiológicos que contribuem para a homeostase dos organismos multicelulares (ALBERTS et al, 2010). Tais processos são regulados a partir de complexas redes interligadas de sinalização celular que dispõem de

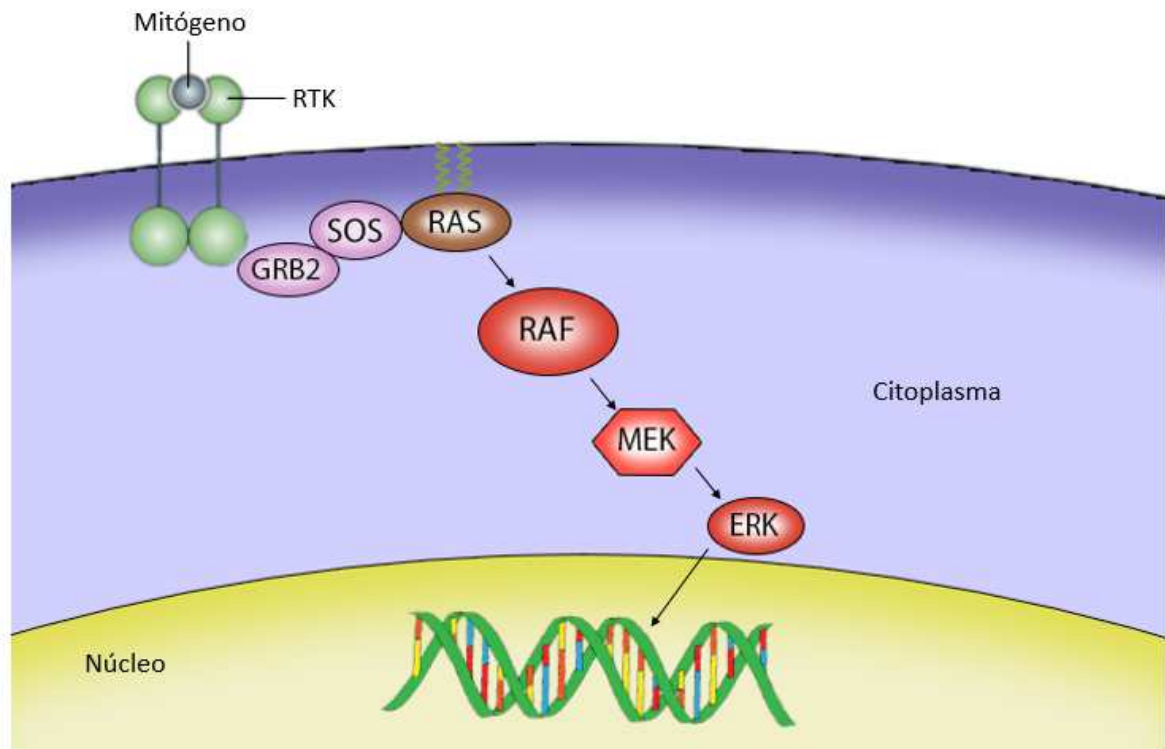
moléculas promotoras de variadas interações intracelulares e que são responsáveis por alterações metabólicas específicas e mudanças na expressão gênica (MARTIN, 2003; ALBERTS et al, 2010).

Diversos processos envolvidos na sobrevivência celular são regulados através de uma via de sinalização altamente conservada em eucariotos: a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK; *mitogens-activated protein kinases*) (SCHAEFFER; WEBER, 1999). Proteínas cinases formam uma superfamília de enzimas reguladoras da função celular que são codificadas por mais de 500 genes em células humanas (MANNING et al, 2002). Elas desempenham a função de fosforilar outras proteínas através da transferência de um grupo fosfato, geralmente a partir de uma molécula de ATP, para substratos proteicos presentes na célula (PETRETTI; PRIGENT, 2005; SILVA et al, 2009). Sendo assim, as MAPK são capazes de desencadear a fosforilação de diversas proteínas intracelulares, tais como fatores de transcrição, cinases e outras enzimas, culminando em eventos de efeito cascata que regulam a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (QI; ELION, 2005). Quaisquer desequilíbrios que ocorram nas vias das MAPK prejudicam a maioria desses eventos celulares, o que beneficiaria o desenvolvimento e progressão do câncer (DHILLON et al, 2007).

A oncogênese tireoidiana frequentemente envolve a ativação constitutiva da via RAS-RAF-MEK-ERK (Figura 5), uma das mais caracterizadas vias de sinalização intracelular das MAPK em mamíferos (CHEN, Z. et al, 2001; QI; ELION, 2005; DHILLON et al, 2007; MORRISON, 2012). A ativação fisiológica desta via consiste na ligação de fatores de crescimento, hormônios e citocinas aos receptores tirosina-cinases (*receptor tyrosine kinases*; RTKs) presentes na membrana celular, tal como o RET. A interação desencadeia a dimerização e a autofosforilação de resíduos de tirosina presentes nestes receptores. As tirosinas fosforiladas dos receptores ativados funcionam como sítios de ancoragem para a Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*). A Grb2 é uma molécula adaptadora que forma um complexo de sinalização com o SOS (*son of sevenless*), um fator de troca do nucleotídeo guanina. O complexo Grb2-SOS ativa a proteína RAS ao induzir a troca de uma GDP acoplada na proteína por uma GTP. Uma vez ativada, a RAS recruta a proteína RAF do citoplasma à membrana celular, permitindo a sua ativação após interação de alta afinidade. Este fenômeno resulta na interação e ativação sequencial de proteínas cinases presentes no citoplasma (*mitogen-activated protein kinase kinase*, MAPKK ou MEK; *extracellular-signal-regulated kinase*, ERK ou MAPK). A ERK ativada migra para o núcleo da célula e fosforila proteínas nucleares

regulatórias, alterando a expressão gênica e regulando atividades biológicas celulares, tais como a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular.

Figura 5 – Representação esquemática da via RAS-RAF-MEK-ERK.



Fonte: Adaptado de Wellbrook, Karasarides e Marais (2004, p. 878).

A maioria das alterações genéticas até então conhecidas que viabilizam a oncogênese tireoidiana em carcinomas bem diferenciados compreendem rearranjos estruturais que envolvem os genes *RET* (*RET/PTC*) e *PAX8* (*paired box 8/peroxisome proliferator-activated receptor gama; PAX8/PPAR $\gamma$* ) e mutações pontuais que afetam os genes *RAS* e *BRAF* (GRECO et al, 2009; BHAIJEE; NIKIFOROV, 2011; ALBAREL et al, 2012; PATEL, K. N., 2013).

Em relação ao CPT, a mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> tem sido apontada como a maior causa de ativação constitutiva da via RAS-RAF-MEK-ERK neste tipo histológico, comportando-se como potente indutor de transformação maligna (KIMURA et al, 2003; CIAMPI; NIKIFOROV, 2005; XING et al, 2007; BHAIJEE; NIKIFOROV, 2011).

## 2.3 BRAF

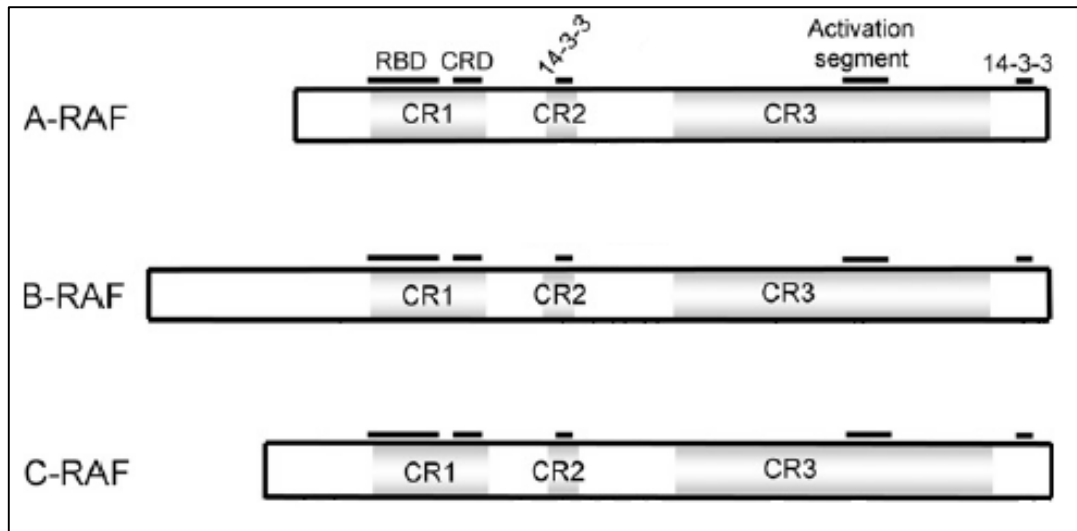
### 2.3.1 Estrutura e mecanismos regulatórios

A proteína BRAF é um membro da família das RAF cinases que é codificada pelo gene *BRAF*. O gene *BRAF* pertence a uma classe de genes denominados oncogenes. Quando mutados, os oncogenes propiciam a transformação de células normais em células cancerosas (CROCE, 2008). Os primeiros genes da família RAF foram identificados como oncogenes virais. Primeiramente foi constatado que um dado oncogene presente em MSV 3611 (*murine sarcoma virus 3611*) era capaz de induzir a transformação maligna em fibroblastos e células epiteliais de roedores MSF/N, sendo assim denominado *virus-induced rapidly accelerated fibrocarcinoma (v-raf)* (RAPP et al, 1983). Posteriormente foi observado que o vírus aviário MH2 (*mill hill n° 2*) também albergava um oncogene potencial (*v-mill*) homólogo ao *v-raf* (JASEN et al, 1983; JANSEN et al, 1984; SUTRAVE et al, 1984). Até o presente momento foram identificados três proto-oncogenes funcionais que codificam RAF cinases em mamíferos: *ARAF* (RAF tipo A); *BRAF* (RAF tipo B) e *CRAF* (RAF tipo C; anteriormente denominado *RAF1*) (CHEN, Z. et al, 2001; BRUMMER et al, 2006; ROSKOSKI, 2010).

O gene *BRAF* foi descrito pela primeira vez em 1988 após ser identificado em células de uma linhagem celular de fibroblastos (NIH-3T3) transfectadas com o DNA de células do sarcoma de Ewing (FUKUI et al, 1985; IKAWA et al, 1988). Em humanos, o gene está localizado na posição 34 do braço longo do cromossomo 7 (7q34) (HILLIER et, 2003), sendo composto por 18 éxons distribuídos em uma região com 20,622 pares de base (bp). O RNA mensageiro transcrito a partir deste gene possui 2,949 bp (BENSON et al, 2013). A proteína BRAF é composta por 766 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de 94 kDa (BENSON et al, 2013). Assim como as outras duas isoformas funcionais pertencentes à família das RAF cinases, a proteína BRAF possui três regiões conservadas (CR) (Figura 6). Próxima à região amino-terminal da proteína se localiza a CR1, que é constituída de um domínio de ligação à proteína RAS (*RAS-binding domain*; RBD) e um domínio rico em cisteína (*cystein-rich domain*; CRD). A CR2 é caracterizada por um domínio rico em serina e treonina e, quando fosforilada, apresenta um sítio de ligação para a proteína regulatória 14-3-3. A CR3, localizada próxima ao terminal carboxil, representa o domínio de proteína cinase, contendo um segmento de ativação. O domínio cinase das proteínas RAF possuem um pequeno lobo amino-terminal, com estrutura

predominante de folha  $\beta$ -pregueada antiparalela contendo uma alça de ligação ao ATP (adenosina trifosfato), sendo uma sub-região rica em glicina denominada *P-loop*, e um grande lobo carboxi-terminal caracterizado por uma estrutura  $\alpha$ -hélice (CHONG; VIKIS; GUAN, 2003; LEICHT, et al, 2007; ROSKOSKI, 2010).

Figura 6 – Representação esquemática da estrutura linear das RAF cinases.



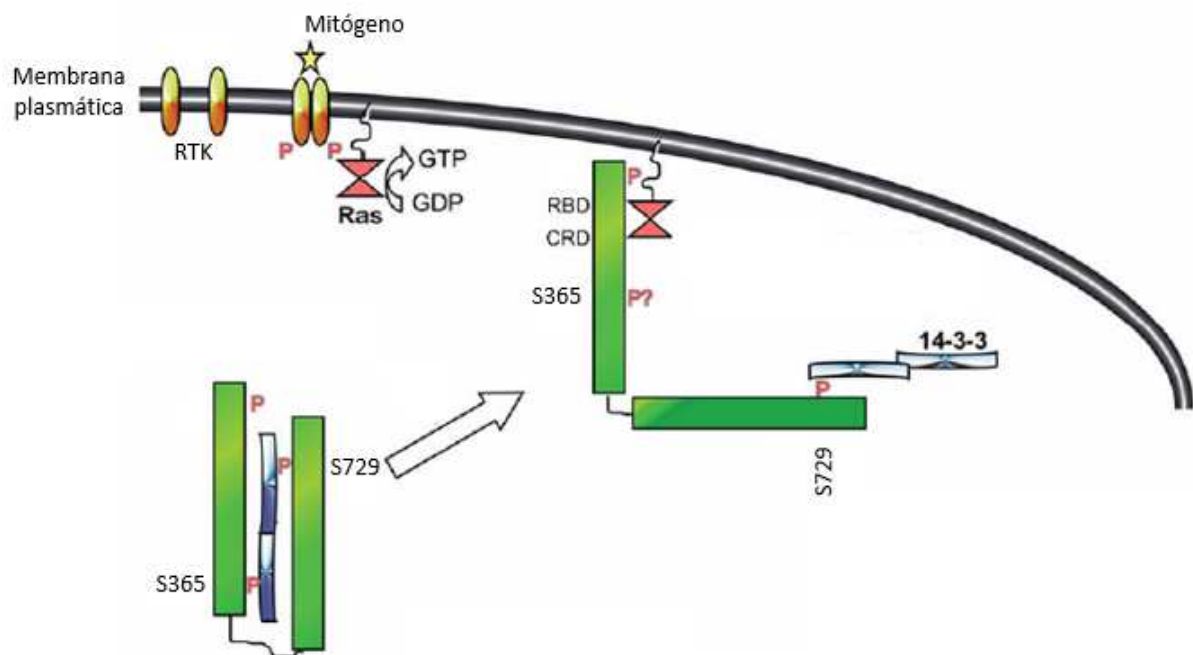
Fonte: Adaptado de Roskoski (2010, p. 314).

De modo geral, os mecanismos regulatórios das RAF cinases envolvem uma série de interações entre proteínas, fosforilação, desfosforilação e alterações conformacionais. Contudo, apesar da semelhança estrutural primária, as três isoformas da proteína RAF possuem distribuições teciduais e propriedades bioquímicas distintas, sugerindo diferentes funções fisiológicas para cada uma delas (CHONG; VIKIS; GUAN, 2002; LEICHT, et al, 2007; ROSKOSKI, 2010; UDELL et al, 2011). A isoforma A-RAF está predominantemente presente nos órgãos urogenitais, enquanto a C-RAF é expresso em células neuronais e tecidos periféricos (STORM; CLEVELAND; RAPP, 1990). A isoforma B-RAF é expressa predominantemente no tecido neuronal, testículo, melanócitos e células hematopoiéticas (EYCHÈNNE et al, 1995). Comparado às outras isoformas, B-RAF constitui o mais potente ativador da via MEK-ERK (PAPIN et al, 1998; MERCER; PRITCHARD, 2003).

Em sua forma basal, a B-RAF é caracterizada pela interação dos dois lobos amino e carboxi-terminais, responsável pelo controle da exposição do sítio catalítico do domínio cinase.

O estado autoinibitório é viabilizado pela fosforilação dos resíduos S365 e S729 da proteína, localizados na CR2 e próximo à região carboxi-terminal, respectivamente, que permitem a ligação das proteínas regulatórias 14-3-3 responsáveis pela estabilização da interação entre os lobos. De todo modo, o recrutamento da proteína B-RAF para a membrana plasmática pela proteína RAS ativada caracteriza o evento inicial do seu processo de ativação. Este recrutamento promove a ligação da RAS aos domínios RBD e CRD da proteína BRAF, localizados no CR1. As interações promovidas pela RAS interferem na estabilidade das ligações das proteínas 14-3-3 aos seus sítios, promovendo alterações na conformação da proteína B-RAF e forçando-a a expor o seu domínio catalítico (Figura 7). A ativação promovida pelo RAS induz a fosforilação de vários resíduos da proteína B-RAF. A fosforilação dos resíduos T599 e S602, localizados dentro do segmento de ativação do domínio cinase, é fundamental para a atividade da proteína. Além disso, a fosforilação do resíduo S579, que ocorre dentro do *P-loop*, permite a interação da proteína com seu substrato (MEK). Já o resíduo S446 é constitutivamente fosforilado, de modo que, aliado a outros resíduos de carga negativa (D448 e D449), contribui para a elevada atividade basal da proteína BRAF (CHONG; VIKIS; GUAN, 2002; LEICHT, et al, 2007; ROSKOSKI, 2010; UDELL et al, 2011).

Figura 7 – Início da ativação da proteína B-RAF: recrutamento à membrana celular pela RAS-GTPase e exposição de sítios catalíticos.



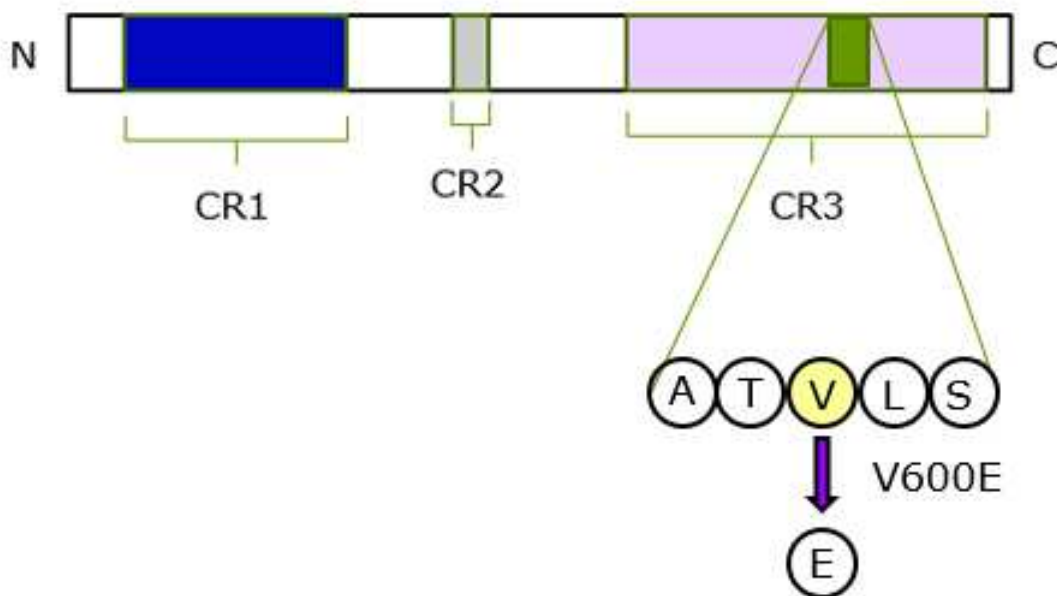
Fonte: Adaptado de Leicht e colaboradores (2007, p. 1204).



### 2.3.2 BRAF e carcinoma papilífero da tireoide

A ativação constitutiva da via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK é comum em vários tipos de câncer. Aproximadamente 15% das neoplasias humanas possuem a forma oncogênica de proteínas da família RAS (MALUMBRES; BARBACID, 2003). Por outro lado, o gene *BRAF* foi estabelecido como um oncogene após Helen Davies e colaboradores (2002) relatarem diversas mutações somáticas ativadoras do gene presentes em um amplo espectro de neoplasias humanas, mais predominantemente em melanomas (66%). Desde então, uma variedade de mutações pontuais identificadas no gene foi descrita (FORBES et al, 2010), quase todas confinadas em duas regiões dentro do domínio cinase: região do *P-loop* (codificada pelo éxon 11) e do segmento de ativação (codificado pelo éxon 15). Dentre estas, destaca-se uma alteração genética que corresponde a mais de 80% das mutações, caracterizada pela troca de uma timina por uma adenina no nucleotídeo 1799 ( $BRAF^{T1799A}$ ), que promove a substituição de uma valina por um ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína codificada ( $BRAF^{V600E}$ ) (Figura 8) (DAVIES, H. et al, 2002; GARNETT; MARAIS, 2004; WAN et al, 2004).

Figura 8 – Representação esquemática da estrutura primária da proteína B-RAF, destacando a troca de uma valina por um ácido glutâmico no resíduo 600 ( $BRAF^{V600E}$ ).



Fonte: adaptado de Kimura (2010, p. 22).

Quanto ao seu mecanismo oncogênico, é importante avaliar que fosforilação dos resíduos S579, T599 e S602 é fundamental para a regulação e atividade da proteína B-RAF *wild-type*, possibilitando a fosforilação e consequente ativação da MEK (ZHANG; GUAN, 2000). A mutação somática BRAF<sup>T1779A</sup> promove a inserção de um aminoácido de carga negativa com propriedade ácida adjacente aos sítios regulatórios da proteína codificada, de modo que mimetiza fosforilação em seu segmento de ativação. Este evento perturbaria as interações hidrofóbicas entre o *P-loop* e o segmento de ativação mantidas pela forma basal do B-RAF, permitindo a formação de novas interações que mantém a proteína constitutivamente ativa, independente da ativação pela RAS, resultando em uma contínua ativação da MEK (DAVIES, H. et al, 2002; WAN et al, 2004; BRUMMER et al, 2006).

Pouco após a constatação inicial da presença de mutações pontuais no gene *BRAF* em diversos tipos de neoplasias malignas, Kimura e colaboradores (2003) relataram pela primeira vez a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em tumores tireoidianos, particularmente em CPT. Na ocasião, foi observado que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> representava a alteração genética mais frequente em CPT, não sendo constatada a sua presença em tumores benignos e em CFT (KIMURA et al, 2003). Desde então, vários estudos semelhantes foram publicados destacando a especificidade da mutação para o CPT (Tabela 5). Também foi observado que, na maioria dos casos, não houve concomitância de outras mutações que afetam os componentes da via MAPK em CPT (KIMURA et al, 2003; SOARES et al, 2003; XU, X. et al, 2003; PUXEDDU et al, 2004; GUERRA et al, 2014), evidenciando que cada uma destas alterações genéticas pode ser suficiente para desencadear o processo de oncogênese. A elevada prevalência associada à ausência de outras alterações genéticas e a alta especificidade para o CPT levantaram a hipótese de que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> poderia auxiliar no diagnóstico de amostras citológicas indeterminadas obtidas pela PAAF e evitar tratamentos cirúrgicos desnecessários em lesões benignas. De fato, quando a mutação é detectada, o valor preditivo positivo para CPT é próximo de 100% (NIKIFOROVA; NIKIFOROV, 2009). Contudo, apesar da alta especificidade para o CPT, a sensibilidade é limitada uma vez que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> não está presente em todos os casos de CPT, de modo que quando a amostra é negativa para a mutação não é possível excluir malignidade. Além disso, em boa parte das amostras citológicas indeterminadas encontram-se lesões foliculares, incluindo CFT e CPT de variante folicular, que mais raramente albergam a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (KIM, M. I.; ALEXANDER, 2012). Portanto, apesar da clara utilidade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> como ferramenta diagnóstica independente para avaliação de nódulos tireoidianos com citologia indeterminada, na prática clínica existe necessidade de

correlação com aspectos clínicos, citológicos e ultrassonográficos (PACINI et al, 2006; COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013).

Tabela 5 – Prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em diferentes neoplasias tireoidianas, obtida por estudos contemporâneos à primeira constatação da presença da mutação em carcinoma papilífero de tireoide.

<b>Prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup></b>				
<b>Referências</b>	<b>Casos mutados/Total de casos</b>			
	<b>Adenoma Folicular</b>	<b>CFT</b>	<b>CMT</b>	<b>CPT (%)</b>
COHEN et al, 2003	0/20	0/13	0/3	24/35 (69)
FUGAZZOLA et al, 2004	0/7	0/5	NA	18/56 (32,1)
FUKUSHIMA et al, 2003	NA	0/8	0/9	40/76 (53)
HAYASHIDA et al, 2004	0/18	0/8	0/1	37/72 (51,4)
KIM, K. H. et al, 2004	NA	NA	NA	58/70 (83)
KIMURA et al, 2003	0/14	0/10	NA	28/78 (35,8)
NAMBA et al, 2003	0/20	0/11	NA	49/170 (28,8)
NIKIFOROVA et al, 2003	0/46	0/32	0/13	45/119 (38)
PUXEDDU et al, 2004	0/6	0/5	NA	24/60 (40)
SALVATORE et al, 2004	0/19	NA	NA	26/69 (37,7)
SOARES et al, 2003	0/51	0/18	NA	23/50 (46)
TROVISCO et al, 2005	NA	NA	NA	45/124 (36)
XING et al, 2004	0/43	0/14	0/14	17/38 (45)
XU, X. et al, 2003	0/18	NA	NA	21/56 (38)
<b>Total</b>	<b>0/262</b>	<b>0/124</b>	<b>0/40</b>	<b>455/1073 (42,4)</b>

NA: não avaliado (lesão não investigada)

Fonte: Elaborado pela autora.

Importa destacar que alguns estudos constataram presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em carcinoma pouco diferenciado de tireoide e CAT que possuíam áreas pré-existentes de CPT BRAF<sup>V600E</sup>-positivo (NIKIFOROVA et al, 2003; BEGUM et al, 2004; SOARES et al, 2004, TAKANO et al, 2007). Uma vez que pode estar presente em todos os estágios de progressão tumoral, dos microcarcinomas papilíferos aos tumores indiferenciados (NIKIFOROVA et al, 2003), foi sugerido que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> poderia ser um evento determinante para a iniciação tumoral. Buscando compreender o papel da mutação neste mecanismo, Knauf e colaboradores (2005) induziram a expressão seletiva do BRAF<sup>V600E</sup> em células foliculares

tireoidianas de camundongos transgênicos (linhagem FVB/N) com o uso de promotor da Tg (Tg-BRAF<sup>V600E</sup>). Em camundongos com elevada expressão da mutação, foi possível observar o estabelecimento precoce de lesão maligna papilífera (12 semanas), presença de tumores multifocais, áreas com características histológicas de células altas e focos de carcinoma pouco diferenciado. Além disso, a expressão do BRAF<sup>V600E</sup> esteve associada com aspectos patológicos agressivos, como a presença de invasão vascular e de estruturas adjacentes (KNAUF et al, 2005). Em outro estudo mais recente, foi realizada a análise do perfil de expressão de genes envolvidos na progressão tumoral a partir de amostras pareadas de CPT e carcinoma pouco diferenciado coletadas de camundongos transgênicos Tg-BRAF<sup>V600E</sup>. Foi observado que os focos de carcinoma pouco diferenciado exibiram alterações consistentes com transição epitélio-mesenquimal: junções celulares desorganizadas, expressão de proteínas mesenquimais, remodelação da matriz extracelular e perda de polaridade celular (KNAUF et al, 2011). Portanto, os autores sugerem que as áreas de indiferenciação em camundongos Tg-BRAF<sup>V600E</sup> representaram fenômeno de progressão tumoral de tumor bem diferenciado para indiferenciado, uma vez que também evidenciaram a perda de expressão da e-caderina, molécula comum em células epiteliais, e que cuja perda de expressão é considerada um evento de indiferenciação em tumores tireoidianos (WISEMAN et al, 2007). Além disso, estudos *in vitro* constataram que a redução da expressão do gene BRAF (*knockdown*) mediada por técnica de RNA interferente transfectado inibiu o crescimento e proliferação promovido pela via RAS-RAF-MEK-ERK de células tireoidianas neoplásicas murínicas e humanas que albergavam a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (SALVATORE et al, 2006; LIU, D. et al, 2007), demonstrando que a mutação não só participa da oncogênese, mas também é necessária para promover e manter a progressão do CPT.

Em seguida, uma série de estudos buscou investigar a associação da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com aspectos clinicopatológicos do CPT. A maioria dos trabalhos até então publicados mostraram maior agressividade nos casos com a presença da mutação quando comparado aos casos negativos. Neste contexto, vários estudos observaram que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> esteve associada à uma ou mais características desfavoráveis e de reconhecido papel no desenvolvimento do tumor papilífero de comportamento agressivo e pior prognóstico clínico (Apêndice B). Duas meta-análises mostraram associação significativa da mutação com o sexo masculino, tamanho tumoral, metástase linfonodal, multifocalidade, EET e estágio clínico avançado (LI, C. et al, 2012; LIU, X. et al, 2014). Além disso, dentre os diversos subtipos histológicos de CPT, a mutação BRAF<sup>V600E</sup> é frequentemente mais associada à forma clássica e à variante de células altas (KEBEBEW et al, 2007; LI, C et al, 2012; VIRK et al, 2013).

Importante salientar que a variante de células altas já possui papel biológico reconhecidamente mais agressivo (GHOSSEIN; LIVOLSI, 2008), como discutido anteriormente.

Alguns estudos também constataram associação positiva da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com doença recorrente, o que sugere que os pacientes acometidos por CPT com a mutação BRAF<sup>V600E</sup> são mais propensos a apresentar recidivas tumorais quando comparados aos casos negativos. Em estudo multicêntrico, Xing e colaboradores (2005) avaliaram retrospectivamente a relação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e recidiva tumoral em 219 pacientes com CPT. Além de relatar a associação da mutação com aspectos clinicopatológicos de maior agressividade tumoral, foi observado, após *follow-up* médio de 15 meses, associação significativa entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e recorrência tumoral, mesmo em casos de baixo estágio clínico inicial (I/II) (XING et al, 2005). Tae Yong Kim e colaboradores (2006) também confirmaram esta associação em uma coorte de 203 pacientes com CPT, demonstrando estreita relação entre a presença da mutação e pior sobrevida livre de doença. Subsequentemente, Elisei e colaboradores (2008) avaliaram pacientes com CPT durante um *follow-up* médio de 15 anos e constataram, por meio de análise multivariada, menor sobrevida livre de doença em casos positivos para a mutação BRAF<sup>V600E</sup>. Estes e outros estudos que investigaram risco de recorrência sugerem possível papel prognóstico da mutação BRAF<sup>V600E</sup> (KEBEBEW et al, 2007; PRESCOTT et al, 2012).

Apesar disto, uma parcela dos estudos até então publicados não encontraram a mesma associação da mutação com aspectos clinicopatológicos desfavoráveis e recorrência tumoral (LIU, R. T. et al, 2005; ITO et al, 2009b; AHN et al, 2012; NAM et al, 2012; PARK, H. S. et al, 2012; PELTTARI et al, 2012; SANCISI et al, 2012; BARBARO et al, 2013; GOUVEIA et al, 2013; JING et al, 2013; KIM, Y. S. et al, 2013). Ainda não há uma justificativa exata para a discrepância dos dados obtidos pelos diferentes estudos, mas algumas limitações são discutidas, tais como: diferenças geográficas e étnicas; delineamento do estudo; número de pacientes incluídos; tipo de amostra tumoral coletada; e, inclusive, o método de detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> aplicado (Apêndice C). Neste atual contexto, o papel prognóstico da positividade para a mutação BRAF<sup>V600E</sup> é controverso, indicando que ainda há necessidade de estudos que tragam mais evidências científicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

- Avaliar a associação da positividade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com aspectos clinicopatológicos do CPT.

#### 3.2 ESPECÍFICO

- Determinar, retrospectivamente, a prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em amostras de tecido tumoral fixados em formalina e conservados em blocos de parafina de casos consecutivos de CPT diagnosticados e tratados no Hospital São Rafael, Salvador – Bahia.

## 4 HIPÓTESES

### 4.1 HIPÓTESE NULA

- Não há associação entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e aspectos clinicopatológicos do CPT em pacientes do grupo de estudo.

### 4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA

- Há associação da presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com aspectos clinicopatológicos do CPT em pacientes do grupo de estudo.

## 5 JUSTIFICATIVA

Os atuais parâmetros clinicopatológicos disponíveis não oferecem precisão na análise do prognóstico dos casos, gerando dúvidas quanto ao manejo clínico e *follow-up* do CPT. Nos últimos anos, o principal esforço direcionado a melhorar o panorama de indicadores prognósticos do câncer de tireoide tem sido o desenvolvimento de ferramentas de análise molecular (WEBER; ENG, 2005; GRIFFITH et al, 2006; SMALLRIDGE; MARLOW; COPLAND, 2009). Dentre os recentes avanços no entendimento da oncogênese tiroidiana, um dos mais promissores achados neste campo foi a caracterização da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT (COHEN et al, 2003; KIMURA et al, 2003).

É possível que a detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> possa servir como ferramenta auxiliar importante na determinação do prognóstico do CPT. No entanto, ainda não está claro se a identificação da mutação BRAF<sup>V600E</sup> isoladamente, independentemente da presença ou ausência de outros aspectos clinicopatológicos, deva direcionar uma abordagem de tratamento e seguimento mais específica e intensificada (SANCISI et al, 2012). As meta-análises publicadas recomendam a realização de novos estudos que busquem evidências mais robustas sobre o impacto da mutação BRAF<sup>V600E</sup> na evolução do CPT (LI, C. et al, 2012; LIU, X. et al, 2014).



## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho foi um estudo retrospectivo de corte transversal unicêntrico com casos consecutivos de CPT de pacientes tratados no Hospital São Rafael – Monte Tabor (HSR), localizado na cidade de Salvador, Bahia, entre Janeiro de 2006 e Dezembro de 2012. A instituição dispõe de serviços de referência para o diagnóstico e tratamento do câncer de tireoide: o Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (SCCP/HSR); o Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia (SAPC/HSR); e o Serviço de Medicina Nuclear (SMN/HSR).

### 6.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram selecionados pacientes consecutivos com suas respectivas amostras tumorais resultantes de ressecções cirúrgicas da tireoide realizadas pelo SCCP/HSR, fixadas em formalina e conservadas em blocos de parafina.

### 6.3 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho amostral baseou-se na taxa de prevalência média de 56,3% da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT observada em recente meta-análise realizada por Xin Liu e colaboradores (2014). O tamanho do universo amostral considerado para o cálculo foi o número de casos de CPT diagnosticados no HSR durante o período de 2006 a 2012 (544 casos). O número de casos obtidos após cálculo amostral foi de 224, tendo em vista o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para tanto, foram consideradas as seguintes variáveis:

- a) Tamanho da população (para o fator de correção da população finita ou fcp)( $N$ ): 544
- b) Frequência % hipotética do fator do resultado na população ( $p$ ): 56,3% $\pm$ 2
- c) Limites de confiança como % de 100(absoluto  $\pm$ -%) ( $d$ ): 5%

d) Efeito de desenho (para inquéritos em grupo-*EDFF*): 1

#### 6.4 GRUPO AMOSTRAL

Casos foram selecionados após a pesquisa de pacientes que obtiveram diagnóstico de neoplasia maligna da tireoide ao exame anatomopatológico (código C73, segundo a Classificação Internacional de Doenças; CID) e que estavam registrados em base de dados disponível em sistema eletrônico interno do SAPC/HSR. Os pacientes inicialmente elegíveis para o estudo foram aqueles cujos laudos anatomopatológicos registrados no sistema eletrônico indicavam diagnóstico de CPT.

Após a seleção dos pacientes diagnosticados com CPT, foi realizada a pesquisa dos respectivos blocos de parafina contendo tecido tumoral (Figura 9A), bem como suas respectivas lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) previamente confeccionadas na época do diagnóstico anatomopatológico (9B). Ambos, blocos e lâminas, estavam mantidos no SAPC/HSR. Nas ocasiões em que as lâminas estavam ausentes ou inadequadas para avaliação e identificação da área tumoral, novas lâminas foram confeccionadas e coradas com HE. Com intuito de confirmar o diagnóstico de CPT, as lâminas HE foram submetidas a revisões cegas (*blind reviews*) por dois médicos patologistas vinculados à instituição participante do estudo (I. G. S; L. E. F. Jr.).

Figura 9 - Tecido tireoidiano de pacientes tireoidectomizados no Hospital São Rafael. A: Blocos parafinados contendo tecido tireoidiano. B: Lâminas contendo corte de tecido tireoidiano coradas com hematoxilina-eosina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Somente após a localização dos blocos parafinados e confirmação do diagnóstico de CPT, foi iniciada a busca de prontuários físicos e eletrônicos dos pacientes para coleta de dados clinicopatológicos.

## 6.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

A seleção dos casos elegíveis para o estudo obedeceu aos seguintes critérios de inclusão: a) pacientes tratados cirurgicamente pelo SCCP/HSR e diagnosticados com CPT pelo SAPC/HSR; b) casos consecutivos registrados entre Janeiro de 2006 e Dezembro de 2012.

Foram excluídos do estudo: a) pacientes que não possuíam laudo anatomopatológico registrado em sistema eletrônico; b) pacientes que não possuíam estadiamento tumoral completo pela classificação TNM (AJCC, 2010); c) casos cujos blocos de parafina contendo tecido tumoral estavam ausentes; d) pacientes com microcarcinomas papilíferos ( $\leq 1$  cm) que não caracterizavam subtipos histológicos raros e que não apresentavam características clinicopatológicas agressivas, incluindo estágio clínico avançado (III/IV), EET, metástase para os linfonodos e à distância; e) ausência de amplificação do exon 15 do gene *BRAF* na reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*; PCR). Os casos excluídos foram substituídos por casos subsequentes segundo data da realização da tireoidectomia.

## 6.6 REVISÃO DE PRONTUÁRIOS

As revisões foram realizadas no SMN/HSR, seguindo protocolo previamente elaborado e revisado por uma equipe de profissionais colaboradores do estudo, composta por médicos atuantes na área de endocrinologia (H. E. R.; J. C. Jr.), cirurgia cabeça e pescoço (C. R. A. L.), patologia clínica (I. C. S.) e medicina nuclear (L. J. L. S.). O protocolo constava de informações consideradas relevantes para o diagnóstico do paciente acometido pelo CPT, bem como aspectos clinicopatológicos (Apêndice D). Para o estudo foram consideradas os seguintes aspectos: idade ao diagnóstico; sexo; história familiar; subtipo histológico; tamanho da lesão tumoral; multifocalidade; invasão vascular; EET; presença de tireoidite de hashimoto (TH); metástase linfonodal e à distância e estadiamento tumoral. O estadiamento tumoral estabelecido foi baseado na 7ª edição do sistema de classificação TNM/AJCC (AJCC, 2010). Com base nas

informações coletadas, todos os pacientes foram classificados quanto ao risco de recorrência tumoral de acordo com os protocolos elaborados e publicados pela ATA e pelo Consenso Brasileiro (COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013).

O preenchimento do protocolo de revisão foi realizado em papel pela mestrande juntamente com dois alunos de iniciação científica (M. F. S. M.; V. M. S. L.), treinados e orientados por um médico endocrinologista (J. C. Jr.). Os protocolos revisados foram então numerados a fim de manter em sigilo a identidade pessoal dos pacientes e em seguida armazenados em caixa-arquivo localizado no Laboratório de Estudo da Tireoide, situado no Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (LET/ICS). Os dados coletados foram inseridos no programa de pacote estatístico *SPSS Statistics for Windows, Version 22.0* (IBM, Armonk) para posterior análise estatística.

## 6.7 AMOSTRAS TUMORAIS

Uma vez localizados os blocos de tecido parafinado dos pacientes e suas respectivas lâminas coradas em HE, foi realizada a identificação da área tumoral por marcação direta na lâmina corada (Figura 10). Para obtenção das amostras tumorais, foram realizadas microdissecções dos blocos selecionados por um técnico em Anatomia Patológica vinculado à instituição participante. Foram realizados pelo técnico quatro cortes histológicos sequenciais de 10  $\mu\text{m}$  de espessura para cada caso/bloco. As lâminas contendo as microdissecções foram encaminhadas aos médicos patologistas, onde foram sobrepostas às suas correspondentes lâminas HE com áreas tumorais previamente marcadas. As áreas de tecido tumoral foram então sobremarcadas e dissecadas manualmente com navalhas descartáveis e estéreis (Leica Biosystems, Alemanha) e transferidas para tubos *ependorfs* (1,5 ml) previamente autoclavados e identificados, resultando em duas amostras tumorais para cada caso (*duplicata*). Em casos de multifocalidade, apenas foram coletados, para análise, os focos de maior extensão (mm). Para o início do estudo molecular, as amostras acondicionadas nos tubos *ependorfs* foram então transferidas para o LET/UFBA.

Figura 10 – Demarcação manual da área tumoral a partir de corte de tecido tireoidiano corado com hematoxilina-eosina.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 6.8 ANÁLISE DA MUTAÇÃO $BRAF^{V600E}$

### 6.8.1 Extração do DNA genômico

A etapa de extração de DNA genômico das amostras tumorais foi precedida por tratamento prévio que consistia na retirada da parafina do tecido tumoral (CARVALHO et al, 2010). Após o processo de desparafinização, a extração de DNA foi realizada seguindo protocolo do fabricante do *Puregene Core Kit B* (Maryland, QIAGEN Sciences). Dois microlitros da amostra foram utilizados para determinação da pureza (A260/A280) e concentração de DNA em ng/ $\mu$ l utilizando Nano Espectrofotômetro KASVI Modelo K23-0002 (KASVI, Curitiba). As amostras de DNA foram estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o início da análise molecular.

### 6.8.2 Reação em cadeia da polimerase

O segmento genômico do exon 15 do gene *BRAF* foi amplificado através da técnica convencional PCR. Antes da padronização da PCR foi realizado o desenho dos *primers*

descritos por Kimura e colaboradores (2003), que são complementares às sequências nucleotídicas anterior e posterior (alvos dos *primers sense* e *antisense*, respectivamente) ao exon 15 do gene *BRAF* (Figura 11), descrito na sequência referência disponível no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), banco de dados de sequências genéticas disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sob o código NG\_007873.3 . A padronização da técnica foi realizada atentando para as seguintes variáveis: quantidade de DNA molde; concentração dos *primers*; temperatura de pareamento dos *primers*; concentração do reagente cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) e número de ciclos, em termociclador *Veriti 96 Well* (Applied Biosystem, Foster City). O segmento genômico de interesse do gene *BRAF* foi amplificado utilizando 5-100 ng/ml de DNA genômico em volume total de 20  $\mu$ l contendo 7,5 pmol de *primers sense* e *antisense* (Invitrogen, Carlsbad), 100  $\mu$ l de dNTPs, 2,0 mM de  $MgCl_2$ , Platinum Taq DNA polimerase *high fidelity*, tampão e água de PCR (Invitrogen, Carlsbad). Após padronização, a PCR passou a ser realizada dentro das seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial em 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 58°C por 30 segundos e temperatura de extensão de 72°C por 45 segundos, e, por fim, uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Figura 11 – Sequências dos *primers sense* e *antisense* selecionadas para amplificação do exon 15 do gene *BRAF*. Mais abaixo, trechos realçados em azul representam a localização das sequências de *primers* em relação ao exon (realçado em marrom).

Primer	Sequência (5' - 3')	pb*
Foward (sense)	AAACTCTTCATAATGCTTGCTCTG	24
Reverse (antisense)	GGCCAAAAATTAATCAGTGGA	22

```

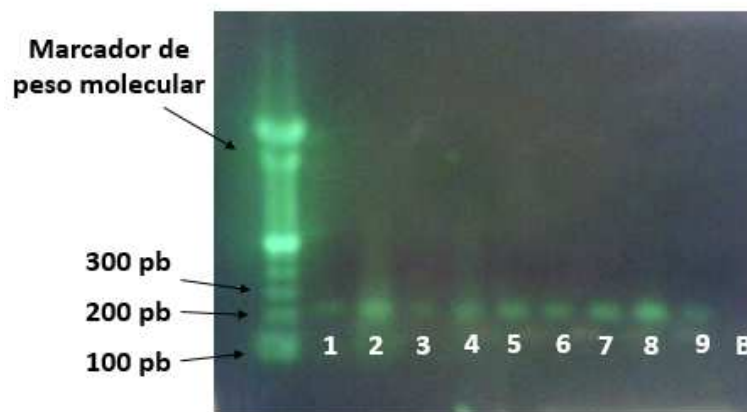
176281 tagaaattag atctcttacc taaactcttc ataatgcttg ctctgatagg aaaatgagat
176341 ctactgtttt cctttactta ctacacctca gatataattc ttcataaga cctcacagta
176401 aaaatagggtg attttggct agctacagtg aaatctcgat ggagtgggtc ccatcagttt
176461 gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg gtaagaattg aggctatatt tccactgatt
176521 aaattttgg ccctgagatg ctgctgagtt actagaaagt cattgaaggt ctcaactata
176581 gtattttcat agttcccagt attcacaaaa atcagtgctt ttatttttta tgtaaataga
176641 ttttttaact tttttcttta cccttaaac gaatattttg aaaccagttt cagtgatatt

```

### 6.8.3 Eletroforese em gel de agarose

A fim de visualizar o padrão das bandas obtidas na PCR (*amplicons*), as amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando *UltraPure™ Agarose* (Invitrogen, Carlsbad,) diluído em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X (*Ultrapure™ TBE Buffer*, Invitrogen, Carlsbad) contendo 0,1µl/ml de *Sybr Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Carlsbad), submetido em corrente de 90v por 45 minutos em sistema de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia, Modelo LCH 13x15, Cotia). O sucesso da PCR foi determinado com a visualização de bandas únicas contendo 231 pares de base no transluminador *Safe Imager 2.0 Blue Light* (Invitrogen, Carlsbad) (Figura 12).

Figura 12 – Visualização das bandas amplificadas de nove amostras após PCR. A densidade da banda reflete as concentrações relativas de DNA amplificado.



Fonte: Elaborada pela autora. Legendas: B: Branco (*blank*); Pb: pares de base.

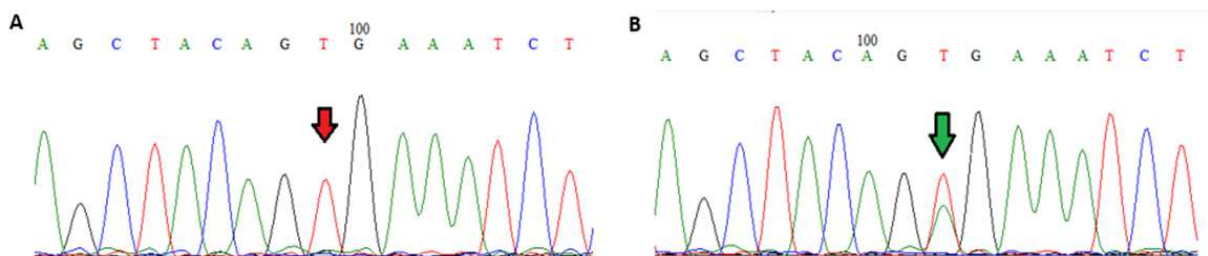
Em casos de ausência de amplificação do exon 15 do gene *BRAF*, foram realizadas novas extrações do DNA genômico a partir das amostras tumorais previamente armazenadas (*duplicatas*). Visando a obtenção de amostras contendo DNA íntegro e de boa qualidade, as etapas de reextração foram realizadas seguindo protocolos dos fabricantes do *QIAamp FFPE Tissue Kit* (Maryland, QIAGEN Sciences) e *ReliaPrep™ gDNA Miniprep System* (Madison, Promega), específicos para extração de DNA a partir de tecidos parafinados. Após as reextrações, as amostras foram submetidas às mesmas etapas de análise da mutação *BRAF<sup>V600E</sup>* anteriormente descritas. Diante da ausência de amplificação, os casos respectivos às amostras não amplificadas foram excluídos do estudo.

### 6.8.4 Sequenciamento direto

Os *amplicons* foram sequenciados para a confirmação da presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup>. Para tanto, estas amostras foram purificadas utilizando colunas do *Purelink Quick PCR Purification Kit* (Invitrogen, Carlsbad), seguindo protocolo do fabricante, e em seguida levados para reação de sequenciamento direto em placas utilizando 2,5 pmol dos *primers* (*forward* e *reverse*) e reagentes do *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Invitrogen, Carlsbad). A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada utilizando solução de isopropanol 70% e com a adição de *Hi-Di™ Formamide* (Applied Biosystem, Foster City). Após a reação, as amostras foram injetadas no sequenciador automático multicapilar *ABI PRISM XL3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City), presente na plataforma de sequenciamento do ICS/UFBA.

As seqüências de nucleotídeos obtidas de cada amostra foram visualizadas através de eletroferogramas gerados pelo sequenciador, utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999). A similaridade das seqüências foi confirmada utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A positividade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi confirmada com a presença da alteração T1799A em heterozigose ou em homozigose nos eletroferogramas avaliados (Figura 13).

Figura 13 – Eletroferogramas apresentam trechos de sequenciamentos de *amplicons*. A: Ausência de substituição nucleotídica, caracterizando um amplificado *wild-type*. B: Presença de dois picos nucleotídicos (heterozigose) na posição 1799 (T1799A).



Fonte: Elaborado pela autora.



## 6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram apresentadas utilizando números e porcentagens, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas utilizando médias e desvio padrão. Para a comparação dos aspectos clinicopatológicos dos pacientes e a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em seus respectivos tumores, foram utilizados o Teste de  $\chi^2$  e Teste Exato de Fisher para os dados categóricos e o Test T de Student para os dados contínuos, cujas distribuições de normalidade foram confirmadas através do Teste Shapiro-Wilk. Foram realizadas análises univariadas (Teste de  $\chi^2$  e Teste Exato de Fisher) para avaliar as associações entre os aspectos clinicopatológicos avaliados e a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> do CPT, além da estratificação inicial de risco de recorrência segundo protocolos do Consenso Brasileiro e da ATA. Regressão logística multivariada foi realizada para identificar possíveis associações independentes. Foram incluídos no modelo de regressão todas as associações significantes observadas nas análises univariadas. Valores de *odds ratio* (OR) foram determinados para investigar a intensidade das associações. A significância entre tais associações foi baseada no valor de  $p \leq 0,05$ , determinado com intervalos de confiança de 95%. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa de pacote estatístico *SPSS Statistics for Windows, Version 22.0* (Armonk, IBM).

## 6.10 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS

Este trabalho foi executado de acordo com a norma 196/96 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade Federal da Bahia (UFBA) após submissão do projeto no sistema eletrônico da Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos (Anexo A). Após análise do projeto e verificação da aprovação do estudo pelo CEP/UFBA, a participação do Hospital São Rafael foi consentida pela Diretoria Médica instituição (Anexo B).

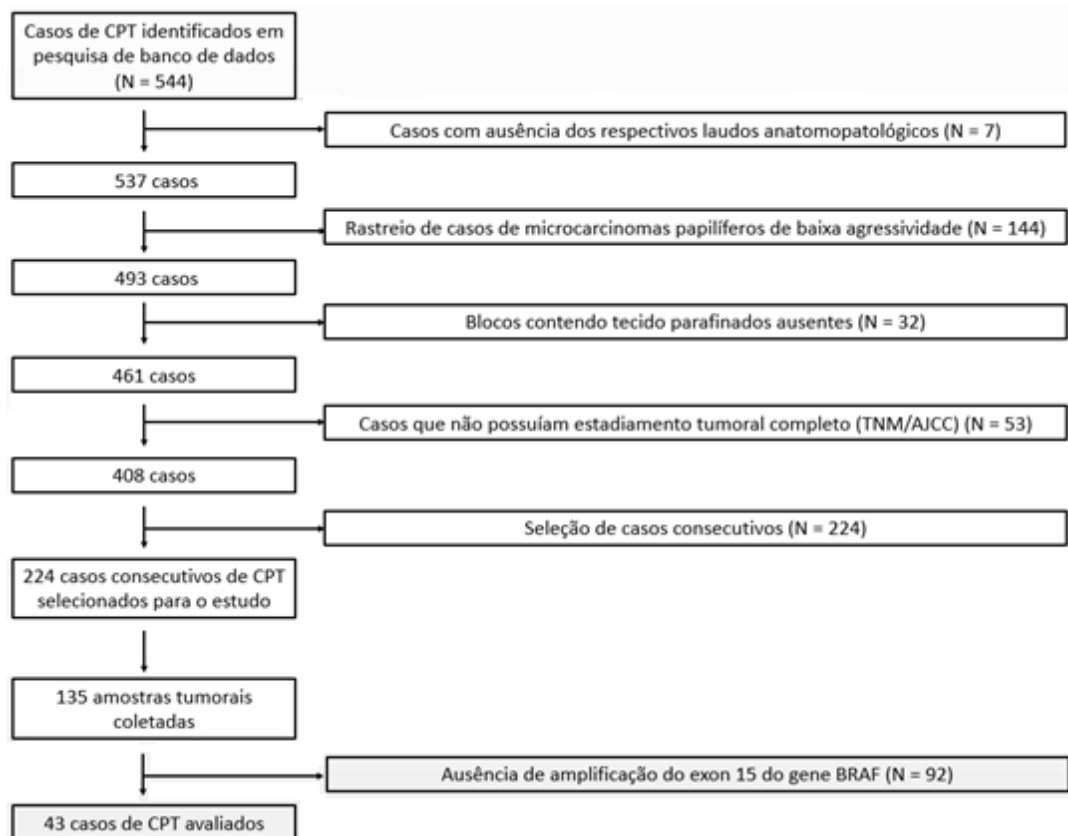
Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB), através do Edital de Apoio a Projetos de Pesquisa do Estado da Bahia (Termo de Outorga: nº APP0040/2011).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 SELEÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL

A Figura 14 apresenta o fluxograma completo das etapas de seleção do grupo amostral.

Figura 14 – Fluxograma da seleção do grupo amostral.

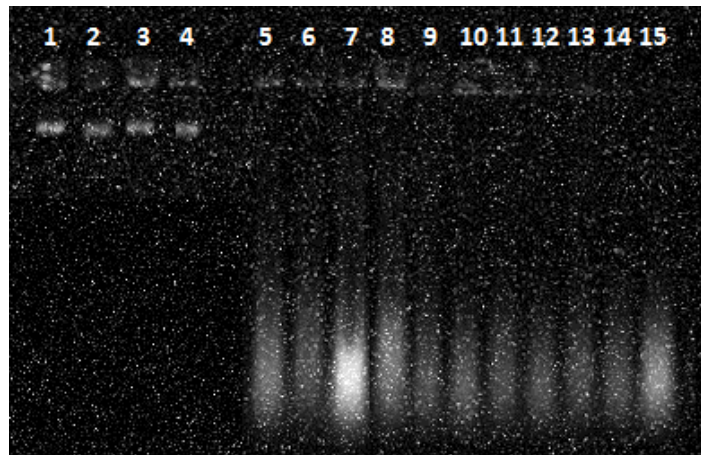


Quinhentos e quarenta e quatro pacientes tratados e diagnosticados com CPT no período entre 2006 a 2012 foram identificados na pesquisa em sistema de banco de dados eletrônico do SAPC/HSR. Laudos contendo dados referentes à avaliação anatomopatológica dos tumores de 7 pacientes não estavam disponíveis no sistema, tornando os casos inelegíveis para o estudo. Com intuito de avaliar tumores clinicamente relevantes, 144 casos de microcarcinomas papilíferos de baixa agressividade (incidentalomas) foram excluídos. Blocos

de parafina contendo tecido tumoral de 32 pacientes não foram localizados, inviabilizando a inclusão destes pacientes no estudo. A revisão de prontuários físicos e eletrônicos dos 461 pacientes restantes constatou ausência de estadiamento tumoral completo (TNM/AJCC) em 53 casos, restando 408 pacientes elegíveis para o estudo. Destes 408 casos, 224 casos consecutivos foram selecionados para integrarem o grupo amostral.

Foram coletadas amostras tumorais de 135 casos incluídos no estudo (60,2%; 135/224). Contudo, mesmo após a aplicação das etapas de reextração com os *kits* específicos para tecido parafinados, as amostras de DNA genômico extraídas mostraram-se inadequadas para a realização da análise molecular para a maioria dos casos elegíveis para o estudo (68,1%; 92/135). Embora fossem obtidas amostras com boas concentrações de DNA (>100ng/mL) e razões A260/280 consideradas adequadas (1.8 – 2.0), foram constatados baixo rendimento e excessiva degradação do DNA obtido após as extrações (Figura 15), resultando na amplificação ineficiente do exon 15 do gene *BRAF* para estas amostras tumorais. Dessa forma, somente foi possível realizar a análise da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> em amostras tumorais de 43 pacientes (31,9%).

Figura 15 – Perfil eletroforético de DNA extraído a partir de tecido parafinado (5-14) em comparação ao DNA extraído a partir de tecido fresco (1-4) previamente armazenado no LET/ICS.



## 7.2 DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS GERAIS

A Tabela 6 apresenta as características clínicas e patológicas gerais dos 43 pacientes incluídos no estudo.

Tabela 6 – Características gerais dos pacientes incluídos no estudo.

<b>Características</b>	<b>N (%)</b> (Total = 43)
<b>Dados clínicos</b>	
<i>Idade (anos)</i>	
Média ± DP	37,04 ± 13,58
Amplitude	12 – 78
< 45 anos	34 (79)
≤ 21 anos	5 (11,6)
22 - 44 anos	29 (67,4)
≥ 45 anos	9 (21)
≥ 60 anos	3 (7)
<i>Sexo</i>	
Masculino	3 (7)
Feminino	40 (93)
<i>História familiar</i>	
	6 (14)
<b>Dados histopatológicos</b>	
<i>Subtipo histológico</i>	
Forma clássica	32 (74,4)
Variante folicular	8 (18,6)
Variante de células altas	1 (2,3)
Variante oxifílica	1 (2,3)
Variante trabecular	1 (2,3)
<i>Tamanho tumoral (mm)</i>	
Média ± DP	19,23 ± 11,36
Amplitude	5 – 50
≤ 10 mm	11 (25,6)
> 10 mm	32 (74,4)
< 20 mm	21 (48,8)
21 - 39 mm	7 (16,3)
≥ 40 mm	4 (9,3)
<i>Tireoidite de Hashimoto</i>	17 (39,5)
<i>Multifocalidade</i>	23 (53,5)
<i>Invasão vascular</i>	3 (7)
<i>Extensão extratireoidiana</i>	3 (7)
<i>Metástase linfonodal</i>	18 (41,9)
<i>Metástase à distância</i>	2 (4,7)
<i>Estadiamento Tumoral (T)</i>	
T1	26 (60,5)
T1a	11 (25,6)
T1b	15 (34,9)
T2	10 (23,3)
T3	7 (16,3)
T4	–

Continuação na próxima página.

Tabela 6 – Características gerais dos pacientes incluídos no estudo (continuação).

<b>Características</b>	<b>N (%)</b> (Total = 43)
<b><i>Estadiamento (N)</i></b>	
N0	25 (58,1)
N1a	11 (25,6)
N1b	7 (16,3)
<b><i>Estadiamento clínico (TNM)</i></b>	
I/II	37 (86)
III/IV	6 (14)
<b>Risco de recorrência</b>	
<b><i>Consenso Brasileiro</i></b>	
Muito baixo	5 (11,6)
Baixo	19 (44,2)
Intermediário 12 (27,9)	
Alto	7 (16,3)
<b><i>ATA</i></b>	
Baixo 17 (39,5)	
Intermediário 20 (46,5)	
Alto	6 (14)

A média de idade ao diagnóstico observada no grupo de estudo foi de  $37,04 \pm 13,58$  anos, com pacientes variando entre 12 e 78 anos. No presente estudo, 34 pacientes (79%) tinham idade inferior a 45 anos, enquanto 9 pacientes (21%) tinham 45 anos ou mais. Cinco pacientes (11,6%) eram menores de 21 anos, 29 (67,4%) tinham entre 22 e 44 anos e outros 3 pacientes (7%) tinham idade igual ou superior a 60 anos. Em relação ao sexo dos pacientes, a maioria pertenceu ao sexo feminino (93%), enquanto apenas 3 eram do sexo masculino (7%). Seis pacientes (14%) apresentavam história familiar de câncer de tireoide em, pelo menos, dois parentes de primeiro grau.

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos à tireoidectomia total. Em relação aos subtipos histológicos apresentados, a forma clássica do CPT foi a apresentação mais frequente (74,4%), seguida da variante folicular (18,6%). Variantes raras foram observadas em 3 pacientes (7%) do grupo de estudo, que consistira de casos de variante de célula altas (1), variante oxifílica (1) e variante trabecular (1). Os tamanhos dos tumores papilíferos apresentados pelos pacientes variaram entre 5 a 50 milímetros (mm), sendo observada média de  $19,23 \pm 11,36$  mm. Destes, 11 (25,6%) representaram microcarcinomas, enquanto 32 tumores (74,4%) apresentaram tamanhos maiores que 10 mm. Quanto aos tumores maiores de

10 mm, 21 (48,8%) casos eram menores ou iguais a 20 mm, 7 (16,3%) tinham entre 21 a 39 mm e 4 casos (9,3%) eram maiores que 40 mm. De acordo com a classificação TNM, a maioria dos pacientes foi categorizada como casos T1 (60,5%), sendo estes 11 casos T1a (25,6%) e 15 casos T1b (34,9%). Dez pacientes (23,3%) representavam casos T2 e 7 pacientes (16,3%) receberam a classificação T3. Não houve pacientes classificados como T4. Achados compatíveis com TH foram observados em 17 casos (39,5%). Vinte e três pacientes (53,5%) apresentaram múltiplos focos tumorais intratireoidianos, sendo 2 casos (4,7%) de multifocalidade unilateral e 21 casos (48,8%) de bilateralidade. Invasão vascular foi observada em 3 casos (7%), assim como EET. Foi constatada a presença de metástases para os linfonodos cervicais em 18 pacientes (41,9%), sendo 11 (25,6%) classificados como casos N1a e 7 (16,3%) como N1b. Apenas dois casos (4,7%) apresentaram metástases à distância (pulmão).

Seis casos (14%) possuíam estágio clínico avançado (III/IV) e consequente elevado risco de mortalidade em comparação aos casos de estágio clínico I/II (86%). Em relação ao risco de recorrência, 24 pacientes (55,8%) apresentaram risco baixo ou muito baixo de acordo com protocolo elaborado pelo Consenso Brasileiro, enquanto que 19 pacientes (44,2%) representavam pacientes de risco intermediário ou alto de recorrência. Quando avaliados conforme o protocolo da ATA, em contraposição à classificação do Consenso Brasileiro, a maioria dos casos representava pacientes de risco intermediário ou alto risco de recorrência (60,4%), enquanto 17 casos (39,5%) representavam pacientes de baixo risco.

O Quadro 1 apresenta os pacientes com estadiamento clínico avançado (III/IV) e suas respectivas categorizações de acordo com a classificação TNM/AJCC, bem como os casos classificados como risco intermediário ou alto de recorrência tumoral de acordo com o Consenso Brasileiro e a ATA e os principais achados que basearam as suas respectivas classificações. Foi observado que entre os casos estabelecidos com estágio clínico baixo (I/II), 9 (22/28) possuíam risco intermediário e 6 possuíam risco alto de recorrência segundo o Consenso Brasileiro. Por sua vez, 18 e 4 casos de estágio clínico baixo apresentaram risco de recorrência intermediário e alto, respectivamente, de acordo com a ATA. Entre os pacientes com estágio clínico avançado (III/IV), foi estimado inicialmente baixo risco de recorrência tumoral apenas para um caso (Caso 1; T1aN1aM0), de acordo com o Consenso Brasileiro. Enquanto isso, apenas um caso com estágio clínico avançado foi classificado, no momento do diagnóstico, como risco baixo de recorrência segundo a ATA (Caso 3; T3N0M0).

Quadro 1 – Pacientes com estágio clínico avançado (III/IV) e/ou com risco intermediário ou alto de recorrência tumoral

	Estratificação de risco de mortalidade		Estratificação de risco de recorrência tumoral			
	TNM/AJCC		CONSENSO BRASILEIRO		ATA	
Caso	Classificação	Estádio clínico	Classificação	Principal achado	Classificação	Principal achado
1	T1aN1aM0	III	Baixo	—	Intermediário	Meta LN
2	T2N1aM0	III	Intermediário	Invasão vascular	Intermediário	Invasão vascular
3	T3N0M0	III	Intermediário	Tumor > 4cm	Baixo	—
4	T3N0M0	III	Intermediário	Invasão vascular	Intermediário	Invasão vascular
5	T3N0M0	III	Alto	RCI	Alto	RCI
6	T1bN0M1	II	Alto	Meta DT	Alto	Meta DT
7	T2N0M1	II	Alto	Meta DT	Alto	Meta DT
8	T3N1bM0	I	Alto	> 10 LN acometidos	Intermediário	Meta LN
9	T3N1aM0	III	Intermediário	pT3; 1-3 LN acometidos	Intermediário	Meta LN
10	T3N0M0	I	Alto	RCI	Alto	RCI
11	T2N1bM0	I	Intermediário	pT2 (2-4 cm); 1-3 LN acometidos	Intermediário	Meta LN
12	T2N1bM0	I	Intermediário	pT2 (2-4 cm); 1-3 LN acometidos	Intermediário	Meta LN
13	T1bN1aM0	I	Baixo	—	Intermediário	Meta LN
14	T1bN1aM0	I	Alto	RCI	Alto	RCI
15	T2N0M0	I	Intermediário	Invasão vascular	Intermediário	Invasão vascular
16	T2N1aM0	I	Alto	> 10 LN acometidos	Intermediário	Meta LN
17	T3N0M0	I	Intermediário	pT3 (2-4 cm)	Intermediário	pT3 (EET mínima)
18	T1bN1bM0	I	Intermediário	Variante de células altas	Intermediário	Variante de células altas
19	T1bN1bM0	I	Intermediário	4-10 LN acometidos	Intermediário	Meta LN
20	T1aN1bM0	I	Intermediário	4-10 LN acometidos	Intermediário	Meta LN
21	T1bN1bM0	I	Intermediário	Captação cervical ectópica	Intermediário	Meta LN

Continuação na próxima página.

Quadro 1 – Pacientes com estágio clínico avançado (III/IV) e/ou com risco intermediário ou alto de recorrência tumoral (continuação)

	Estratificação de risco de mortalidade		Estratificação de risco de recorrência tumoral			
	TNM/AJCC		CONSENSO BRASILEIRO		ATA	
Caso	<i>Classificação</i>	<i>Estádio clínico</i>	<i>Classificação</i>	<i>Principal achado</i>	<i>Classificação</i>	<i>Principal achado</i>
22	T1bN1aM0	I	Baixo	—	Intermediário	Meta LN
23	T1aN0M0	I	Muito baixo	—	Intermediário	Meta LN
24	T1bN0M0	I	Intermediário	Tumor > 4 cm	Baixo	—
25	T1aN1aM0	I	Baixo	—	Intermediário	Meta LN
26	T1aN1aM0	I	Baixo	—	Intermediário	Meta LN
27	T1aN1aM0	I	Baixo	—	Intermediário	Meta LN
28	T1aN1aM0	I	Baixo	—	Intermediário	Meta LN

**Legenda:**  
EET: Extensão extratireoidiana      LN: Linfonodos      Meta DT: Metástase à distância      Meta LN: Metástase linfonodal  
RCI: Ressecção cirúrgica incompleta



7.3 MUTAÇÃO BRAF<sup>V600E</sup> E ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS

A prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> nas amostras tumorais amplificadas e sequenciadas no grupo de estudo foi de 65,1% (28/43). Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup>. A associação entre a mutação e os aspectos clinicopatológicos apresentados pelos 43 pacientes estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e aspectos clinicopatológicos dos pacientes do estudo.

Variáveis	BRAF <sup>V600E</sup> (-) (n = 15)	BRAF <sup>V600E</sup> (+) (n = 28)	Valor de p
<b>Idade ao diagnóstico</b>			<b>0,024</b>
≤ 21 anos	4 (26,7)	1 (3,6)	
22 - 44 anos	11 (73,3)	18 (64,3)	
≥ 45 anos	–	9 (32,1)	
≥ 60 anos	–	3 (10,7)	
Média ± DP	29,73 ± 10,18	40,96 ± 13,69	<b>0,008†</b>
<b>Sexo</b>			0,541†
Feminino	15 (100)	25 (89,3)	
Masculino	–	3 (10,7)	
<b>História familiar (+)</b>	1 (6,7)	5 (17,9)	0,403†
<b>Subtipo Histológico</b>			0,189†
Clássico	9 (60)	23 (82,1)	
Variante Folicular	5 (33,3)	3 (10,7)	
Variante de Células Altas	1 (6,7)	–	
Variante Oxifílica	–	1 (3,6)	
Variante Trabecular	–	1 (3,6)	
<b>Tamanho do maior nódulo (mm)</b>			0,497†
Média ± DP	17,6 ± 9,51	20,1 ± 12,32	
<b>Multifocalidade (+)</b>	7 (46,7)	16 (57,1)	0,512†
Unilateral	1 (6,7)	1 (3,6)	
Bilateral	6 (40)	15 (53,6)	
Ausência	8 (53,3)	12 (42,9)	
<b>Invasão vascular (+)</b>	1 (6,7)	2 (7,1)	1†
<b>Extensão Extratireoidiana (+)</b>	–	3 (10,7)	0,541†
<b>Tireoidite de Hashimoto (+)</b>	10 (66,7)	7 (25)	<b>0,008†</b>
<b>Metástase Linfonodal (+)</b>	7 (46,7)	11 (39,3)	0,751†
<b>Metástase à distância (+)</b>	1 (6,7)	1 (3,6)	1†

Continuação na próxima página.

Tabela 7 – Associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e aspectos clinicopatológicos dos pacientes do estudo (continuação).

Variáveis	BRAF <sup>V600E</sup> (-) (n = 15)	BRAF <sup>V600E</sup> (+) (n = 28)	Valor de p
<b>Estadio clínico (AJCC/TNM)</b>			0,095†
I	13 (86,6)	21 (61,8)	
II	2 (13,3)	1 (3,6)	
III	–	6 (21,4)	
IV	–	–	
<b>Risco de recorrência tumoral</b>			
<i>Consenso Brasileiro</i>			0,787†
Muito baixo	1 (6,7)	4 (14,3)	
Baixo	8 (53,3)	11 (39,3)	
Intermediário	4 (26,6)	8 (28,6)	
Alto	2 (13,3)	5 (17,8)	
<i>ATA</i>			0,368†
Baixo	5 (33,3)	12 (42,9)	
Intermediário	9 (60)	11 (39,3)	
Alto	1 (6,7)	5 (17,9)	

**Legenda:**

† Teste de Qui quadrado ou Teste de Fisher

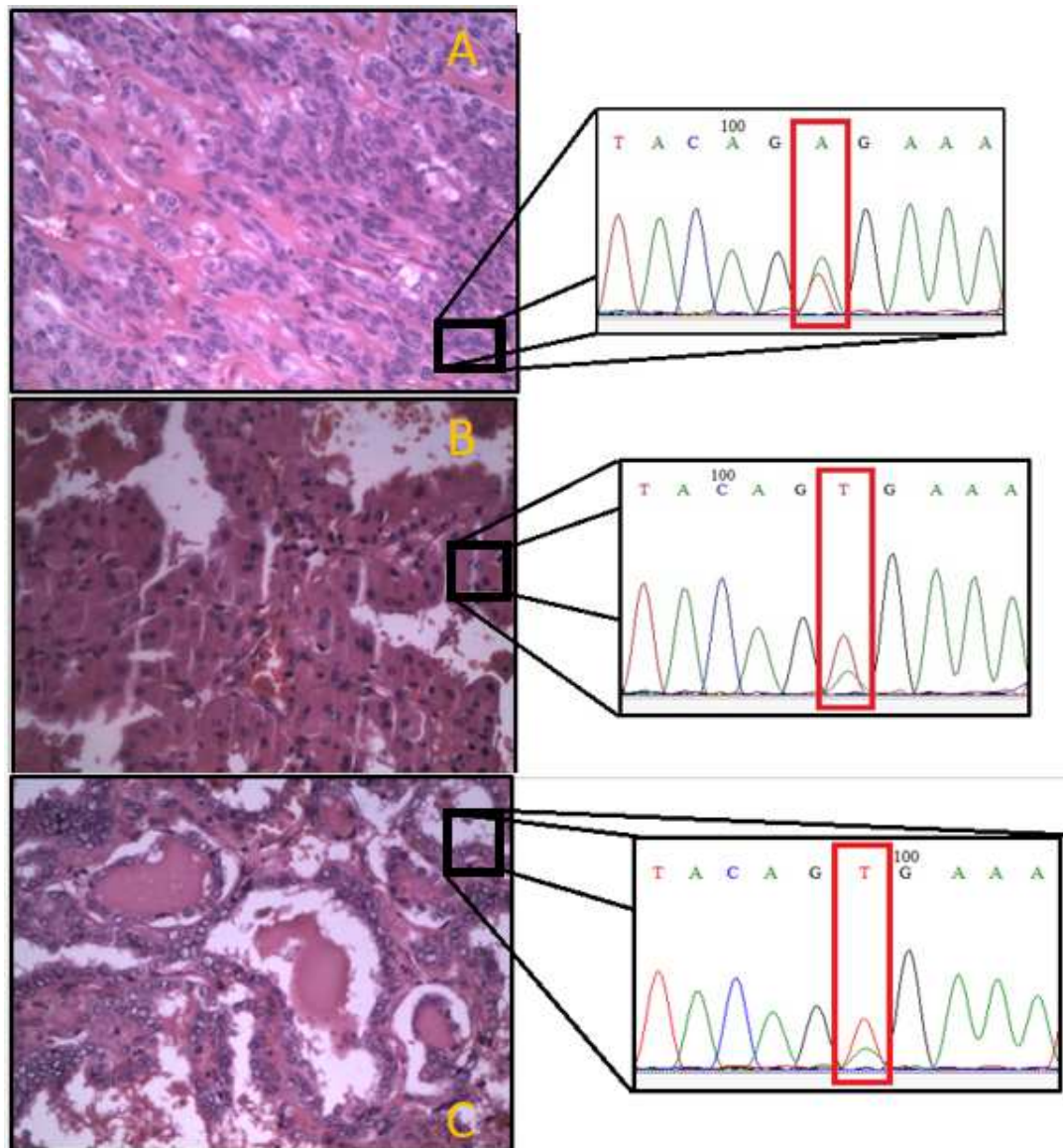
‡ Teste T de Student

A partir da análise entre os grupos foi observado que os pacientes BRAF<sup>V600E</sup> positivos possuíam idade mais avançada quando comparado ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo ( $40,96 \pm 13,69$  vs  $29,73 \pm 10,18$ ;  $P = 0,008$ ). Quando avaliado de forma categórica a distribuição por faixas etárias (Tabela 7), diferença estatística significativa entre os grupos positivo e negativo para a mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi encontrada em relação à idade ao diagnóstico do paciente ( $P = 0,024$ ). Assim como as médias observadas, as frequências relativas para cada faixa etária demonstraram que os pacientes BRAF<sup>V600E</sup> positivos apresentaram idade mais avançada ( $\geq 45$  anos) quando comparado aos casos negativos (32,1% vs 0%), incluindo os únicos três pacientes com mais de 60 anos. Por outro lado, houve frequência baixa da mutação BRAF<sup>V600E</sup> entre os pacientes  $\leq 21$  anos (1/5 casos), sendo apenas um paciente desta faixa etária pertencente ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo (3,6%).

Embora nenhuma significância estatística tenha sido observada em relação ao sexo e história familiar de câncer de tireoide dos pacientes, todos os indivíduos do sexo masculino e a maioria dos pacientes com história familiar de câncer de tireoide pertenceu ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo (3/3 e 5/6 casos; respectivamente).

Em relação às características anatomopatológicas dos tumores, os únicos casos de variante oxifílica (1) e variante trabecular hialinizante (1) possuíam a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (Figura 16), mas não foi constatada a presença da mutação na única variante de células altas. A forma clássica do CPT foi igualmente predominante entre os grupos negativo e positivo para a mutação BRAF<sup>V600E</sup>, enquanto que os casos de variante folicular concentraram-se no grupo de tumores BRAF<sup>V600E</sup> negativos (33,3% vs 10,7%). Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos BRAF<sup>V600E</sup> positivo e negativo no que diz respeito ao subtipo histológico ( $P = 0,189$ ).

Figura 16 – Visualização por microscopia óptica das variantes raras e CPT clássico BRAF<sup>V600E</sup> positivos. A: Variante trabecular hialinizante; B: Variante oxifílica (oncocítica); C: Forma clássica.



Quando avaliadas as médias de tamanho tumoral dos grupos, não foi observada diferença estatística (Grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo:  $20,1 \pm 12,32$  vs Grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo:  $17,6 \pm 9,51$ ;  $P = 0,497$ ). O grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo, embora não estatisticamente significativo, apresentou maior frequência de casos com invasão vascular (7,1% vs 6,7%;  $P = 1$ ), EET (10,7% vs 0%;  $P = 0,541$ ) e multifocalidade tumoral (57,1% vs 46,7%;  $P = 0,512$ ), inclusive com mais casos de bilateralidade em relação ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo (53,6% vs 40%). Houve diferença estatística significativa na distribuição dos casos de CPT associados à TH entre os grupos, sendo a sua presença observada com mais frequência entre os casos negativos para a mutação (25% vs 66,7%;  $P = 0,008$ ).

A maioria dos pacientes que apresentaram metástases para os linfonodos cervicais pertenceram ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo (11/18 casos), no entanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos BRAF<sup>V600E</sup> positivo e negativo em relação a prevalência deste achado (39,3% vs 46,7%;  $P = 0,751$ ) (Tabela 7). Os únicos dois casos de metástase à distância foram igualmente distribuídos entre os grupos positivo e negativo para a mutação BRAF<sup>V600E</sup>.

Ao final, todos os casos com estágio clínico avançado (III/IV) pertenceram ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo. Em relação à classificação de risco de recorrência tumoral, houve maior concentração de casos com risco intermediário ou alto de recorrência no grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo quando comparado ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo (46,4% vs 39,9%;  $P = 0,787$ ), de acordo com o Consenso Brasileiro (Tabela 7). Por outro lado, houve prevalência elevada casos com risco intermediário ou alto, segundo a ATA, entre os casos BRAF<sup>V600E</sup> negativos (66,7% vs 57,2%;  $P = 0,537$ ). Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos BRAF<sup>V600E</sup> positivo e negativo (Tabela 7).

Com o propósito de compreender a relevância prognóstica da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em relação aos aspectos clinicopatológicos do CPT, bem como identificar possíveis associações independentes, foi realizada análise multivariada de regressão logística envolvendo apenas as associações que foram significativas (valor de  $P \leq 0,05$ ) na Tabela 7. Para tanto, foram realizados ajustes para vários fatores prognósticos que a literatura tem associado com o desfecho clínico avaliado (Tabela 8).

Tabela 8 – Análises univariada e multivariada da associação da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com aspectos clinicopatológicos do CPT.

Mutação BRAF <sup>V600E</sup>						
Variáveis	Análise univariada <sup>P</sup>			Análise multivariada		
	OR bruto	IC 95%	Valor de <i>p</i>	OR ajustado	IC 95%	Valor de <i>p</i>
<b>Idade<sup>T</sup></b>						
≤ 21 anos	0,1	0,01 - 1,01	<b>0,043</b>	0,09	0 - 1,3	0,078
≥ 45 anos	1,47	1,14 – 1,90	<b>0,014</b>	1,87	0,11 – 3,40	0,998
<b>TH</b>	0,16	0,04 - 0,65	<b>0,008</b>	0,14	0,02 - 0,77	<b>0,024</b>

**Para análise univariada:**

P: Teste de Qui Quadrado e Teste Exato de Fisher

**Para análise multivariada:**

<sup>T</sup>: Ajustado por tamanho tumoral, tireoidite de Hashimoto, invasão vascular, EET, metástase linfonodal e metástase à distância.

†: Ajustado por idade, tamanho tumoral, EET e metástase linfonodal

A Tabela 8 apresenta associações observadas entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e idade ao diagnóstico (≤ 21 anos e ≥ 45 anos) e achado de TH associado ao tumor papilífero. Em relação à idade ao diagnóstico igual ou inferior a 21 anos, a associação negativa observada na análise univariada também foi apresentada na análise multivariada (OR: 0,10 e 0,09, respectivamente). No entanto, não houve significância estatística na associação negativa após análise multivariada ( $P = 0,078$ ), evidenciando possível interação de confundidores nesta associação. Houve associação positiva entre idade igual ou superior a 45 anos (OR: 1,47), mas a associação também perdeu significância após os ajustes da análise multivariada ( $P = 0,998$ ). Em relação à associação entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e TH associada ao tumor, a associação negativa observada na análise univariada permaneceu significativa após análise multivariada ( $P = 0,024$ ), evidenciando o efeito protetor independente desta comorbidade sobre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (OR: 0,14).

## 8 DISCUSSÃO

Na prática clínica, tecidos provenientes de ressecções cirúrgicas podem ser congelados, mantidos a fresco ou estabilizados com um fixador que assegura a preservação da arquitetura tecidual e morfologia celular. Dentre os diversos tipos de fixadores utilizados na rotina laboratorial, o formaldeído na forma de formalina é reconhecido como fixador universal, amplamente utilizado pelos serviços de Patologia (SRINIVASAN; SEDMAK; JEWELL, 2002). Tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina tornaram-se fontes valiosas de pesquisa no âmbito da Biologia Molecular nos últimos anos, especialmente para estudos sobre as bases genéticas das doenças. Devido à praticidade da disponibilidade dos blocos de parafina pelos serviços de Patologia de instituições médicas e/ou acadêmicas, muitos pesquisadores optam pela utilização dos blocos de tecido parafinados para estudos retrospectivos de longo prazo.

A literatura tem demonstrado que o sucesso da extração do DNA a partir de tecidos parafinados fixados em formalina tem sido bastante variável (DOUGLAS; ROGERS, 1998; SERTH et al, 2000). No presente estudo, a qualidade e a integridade do DNA extraído a partir da maioria das amostras tumorais do tecido tireoidiano dos pacientes do grupo amostral foram prejudicadas, impossibilitando a amplificação do exon 15 do gene *BRAF* pela técnica de PCR convencional na maioria das amostras selecionadas. Evidências sugerem que a formalina é capaz de induzir a degradação do DNA (WILLIAMS et al, 1999; SRINIVASAN; SEDMAK; JEWELL, 2002). A degradação tem sido atribuída principalmente a fatores inerentes ao processamento do material, que incluem o tempo e a temperatura de fixação do tecido, e o pH e a concentração da formalina utilizada (TOKUDA et al, 1990; FOSS et al, 1994; DOUGLAS; ROGERS, 1998; LEHMANN; KREIPE, 2001; ZIMMERMANN et al, 2008; NILAND et al, 2012). Visando padronizar o processamento das peças anatômicas recebidas, o SAPC/HSR passou a adotar critérios mais rígidos para o processamento dos tecidos somente em 2012. Uma vez que o presente estudo também incluiu blocos de tecido parafinado datados antes de 2012, a integridade do material genético proveniente das amostras tumorais coletadas para análise da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> pode ter sido comprometida em razão do processamento inadequado do material.

Tendo em vista este viés metodológico, profissionais de setores de Patologia e pesquisadores interessados em acessar tecidos parafinados para pesquisa em análise genética

devem atentar para a identificação de possíveis fatores que afetam qualidade do material. Caso estes fatores não possam ser identificados ou reparados, faz-se necessária a avaliação da qualidade das amostras de DNA obtidas após extração. Para tanto, baseado na experiência do presente estudo, a aplicação das amostras em sistema de eletroforese em gel de agarose torna-se um método qualitativo prático e rápido para a verificação da ocorrência de degradação (SIWOSKI et al, 2002). Visualização de “borrões” (*smears*) ao longo do gel ao invés de bandas visíveis e de alto peso molecular indica amostras contendo DNA degradado, ou seja, fragmentado em tamanhos menores. Dessa forma, degradação do DNA oferece limitações críticas para a amplificação de sequências de interesse, dificultando o reconhecimento dos *primers* às sequências, e reduzindo de maneira significativa a quantidade de produtos da PCR. A escolha por sequências alvos para amplificação e desenho de *primers* cada vez menores poderia solucionar este problema, mas ainda haveria o risco da perda da especificidade da amplificação. Submissão das amostras a números maiores de ciclos da PCR ou aplicação do PCR *Nested* também seriam outras estratégias, uma vez que, a princípio, maximizariam a quantidade de produtos da PCR de amostras contendo baixas concentrações de DNA molde. No entanto, estas abordagens muitas vezes não produzem o efeito desejado, por exemplo: quando há poucas sequências moldes disponíveis, a ligação dos *primers* pode não ocorrer de forma igual para cada alelo durante os primeiros ciclos da PCR, resultando em desequilíbrio entre os produtos alélicos (BUDOWLE; EISENBERG; VAN DAAL, 2009), oferecendo, assim, interpretações menos confiáveis.

Ainda há opção da utilização de *kits* comerciais voltados especialmente para extração de DNA a partir de tecidos parafinados. No presente estudo, três *kits* para extração de DNA foram utilizados. Projetado para purificação de DNA genômico, mitocondrial e viral a partir de amostras de diversas origens, o kit *Puregene Core* tem como princípio básico a digestão enzimática das membranas celulares através da proteinase K durante longos períodos de incubação, que podem variar de 3 horas a 3 dias. Por outro lado, os *kits* específicos para tecido parafinado (*QIAamp* e *Reliaprep*), otimizam a purificação do DNA sem a necessidade de incubações *overnight*. Baseados em propriedades de ligação seletiva do DNA às membranas de sílica e de eluição, os métodos empregados pelos *kits* promovem a remoção das ligações cruzadas formadas entre o formaldeído e as moléculas de DNA sem a necessidade de longos períodos de incubação após digestão por proteinase K. Diversos estudos observaram resultados satisfatórios na amplificação de DNA após extrações com kits específicos para tecido parafinado (SIMONATO et al, 2007; CANNON-ALBRIGHT et al, 2011; LUDYGA et al,

2012; RABELO-GONÇALVEZ et al, 2014). Resultados obtidos da extração de DNA segundo protocolos de cada *kit* empregado no presente estudo foram semelhantes, apresentando concentrações e purzas de DNA, a princípio, adequadas. Contudo, os protocolos dos *kits* *QIAamp* e *Reliaprep* foram ineficazes para o estudo uma vez que, assim como o *kit Puregene Core*, não viabilizaram amplificação das amostras de DNA. Portanto, quantidades suficientes de DNA nem sempre refletem a quantidade de DNA molde necessária para o êxito da PCR.

Além da otimização das técnicas de extração para maximizar o rendimento das amostras de DNA, o foco na busca por novas estratégias de amplificação que pudessem sobrepor ou mesmo reparar o DNA fragmentado tem demonstrado resultados promissores. Recentes avanços em métodos de amplificação do genoma inteiro (*whole genome amplification*; WGA) oferecem uma saída para a recuperação de amostras degradadas. Sendo um dos métodos utilizados para a WGA, a amplificação por deslocamentos múltiplos (*multiple displacement amplification*; MDA) envolve processo de preparação do DNA fragmentado que resulta na ligação enzimática dos fragmentos de DNA em ordens aleatórias. Apesar das sequências não corresponderem à ordem da sequência original, a detecção de polimorfismos não é afetada. Assim, a reação de WGA é realizada, resultando em amostras amplificadas de DNA íntegro ou de tamanhos maiores disponíveis para análises moleculares subsequentes (HUANG et al, 2000; SILANDER; SAALERA et al, 2008). Diversos *kits* comerciais baseados nesta técnica foram desenvolvidos para amostras provenientes de tecidos parafinados, tais como o *REPLI-g FFPE* (Maryland, QIAGEN Sciences) e o *GenomiPhi Amplification* (Little Chalfont, GE Health Care). Muitos estudos empregaram estes ou outros *kits* comerciais semelhantes para amplificação de DNA de tecidos parafinados, inclusive para investigação de mutações no gene *BRAF* (BERRES et al, 2014). No entanto, nem todos obtiveram resultados satisfatórios (MACIEJEWSKA; JAKUBOWSKA; PAWLOWSKI, 2013), sugerindo que o método ainda é limitado para análise de amostras de DNA gravemente degradadas.

Devido à degradação do material genético da maioria das amostras tumorais pelas razões anteriormente citadas, a análise da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> foi realizada em apenas 43 pacientes. Diversos estudos reportaram a taxa de prevalência da mutação em CPT, que variou entre 23 a 69% (COHEN et al, 2003; NAMBA et al, 2003). De acordo com dados da meta-análise de Ju-Han Lee, Eung-Seok Lee e Young-Sik Sim (2007) com estudos publicados antes de 2006, a mutação está presente em cerca de 49% dos casos, sendo portanto a alteração genética mais frequente em CPT.



No presente estudo, a mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi identificada em 28/43 (65,1%) dos tumores papilíferos consecutivos tratados entre 2006 e 2012 no Hospital São Rafael, na cidade de Salvador. Até o momento, não há outros estudos publicados que tenham investigado a prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT na população do Estado da Bahia. No entanto, a prevalência elevada da mutação observada no presente estudo esteve em conformidade com os achados de alguns outros estudos que avaliaram a população brasileira. Dois estudos conduzidos no Hospital Araújo Jorge, centro de referência em diagnóstico e tratamento do câncer no Centro-Oeste brasileiro localizado na cidade de Goiânia, reportaram taxas de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT semelhantes à observada no presente estudo. Silva (2012) reportou taxa de prevalência da mutação de 63,8% em amostras tumorais de 116 casos de CPT diagnosticados entre 2000 e 2005. Por sua vez, Gontijo (2012) observou taxa de prevalência de 62,5% da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em 80 casos de microcarcinoma papilífero diagnosticados entre 1996 e 2008. No entanto, cabe mencionar que apesar de ambos estudos também terem utilizado amostras tumorais oriundas de tecido parafinado, estes empregaram o método de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism*; RFLP) aliada à PCR para detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> (GONTIJO, 2012; SILVA, 2012). No presente estudo, houve o emprego da técnica de sequenciamento direto, que já foi apontado como método de maior acurácia para a detecção de polimorfismos de nucleotídeo único quando comparado à técnica de RFLP-PCR (DAVIS et al, 2007), que possui limitação em discriminar genótipos apenas pelo tamanho do fragmento obtido.

Estudos conduzidos em São Paulo observaram menores taxas de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em relação à observada no presente estudo. Dutenhefner (2011) observou em uma coorte de 51 casos consecutivos de CPT, diagnosticados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, taxa de prevalência de 29,4% da mutação BRAF<sup>V600E</sup>, empregando método de PCR convencional seguida por sequenciamento direto. Este estudo optou pela investigação da presença da mutação em tumores provenientes tanto de tecido fresco quanto de tecido parafinado (DUTENHEFNER, 2011). No entanto, este trabalho não descreve qual tipo de material foi priorizado, de modo que limita a avaliação da taxa de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em comparação a outras casuísticas. Por outro lado, Oler e Cerutti (2009) conduziram estudo retrospectivo na mesma instituição utilizando apenas tecido fresco de 120 pacientes com CPT diagnosticados entre 2000 e 2007. Através do método de sequenciamento direto, foi observada taxa de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> de 48% (OLER; CERUTTI, 2009).

Ainda que os dados representem um número reduzido de pacientes avaliados, outras características do presente estudo poderiam explicar a observação de taxa de prevalência mais elevada. A seleção não-randomizada, a opção por análise retrospectiva e a grande perda amostral causada pela dificuldade técnica da amplificação do exon 15 do gene *BRAF* podem ter constituído um viés de seleção ao incluir em maior proporção pacientes com tumores mais agressivos e com elevado risco de recorrência, características associadas com a mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> em estudos prévios (LI, C. et al, 2012; LIU, X. et al, 2014). Xiaolong Lee e colaboradores (2009) investigaram a mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> em 64 casos de microcarcinomas papilíferos e observaram que tumores *BRAF*<sup>V600E</sup> positivos exibiram de forma significativa sinais de agressividade, tais como estágio clínico avançado, EET e metástase para os linfonodos. Embora o mesmo achado não tenha sido observado por outros estudos (KIM, T. Y, 2005; WALCZYK et al, 2014), a inclusão seletiva de microcarcinomas papilíferos com características clinicopatológicas agressivas no presente estudo pode ter constituído outro viés que contribuiu para a maior detecção da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup>.

A população do presente estudo foi constituída por pacientes diagnosticados e tratados após 2006. Cabe destacar que a literatura tem reportado mudanças temporais no perfil mutacional do CPT, de modo que a prevalência da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> tem aumentado significativamente em relação aos tumores tratados no passado (SMYTH et al, 2005; MATHUR et al, 2011; ROMEI et al, 2012). Estudo multicêntrico conduzido por Romei e colaboradores (2012) na Itália demonstrou aumento significativo da prevalência da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> entre 1996 e 2010 (28% vs 58,1%;  $P = < 0,0001$ ), e, em contraste, decréscimo da frequência de rearranjos RET/PTC (33% vs 9,8%;  $P = < 0,0001$ ). Tendo em vista que os grupos de pacientes avaliados pelo estudo não apresentavam diferenças significativas em relação à idade ao diagnóstico, tamanho tumoral e presença de metástases locais e à distância, os achados do estudo sugerem que fatores ambientais possam ter influenciado o aumento da incidência da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> (ROMEI et al, 2013).

Estudos têm apontado que alto consumo de iodo poderia ter impacto na prevalência da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup>. Estudos recentes na China, Coreia do Sul e Japão observaram elevada prevalência da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup>. Somente na Coreia do Sul, a taxa de prevalência da mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> em CPT varia entre 50 a 91% (MOON, H. J. et al, 2009; KIM, S. K. et al, 2011). Guan e colaboradores (2009) selecionaram randomicamente para estudo epidemiológico 1032 casos de CPT de pacientes provenientes de cinco regiões da China que apresentavam diferentes taxas de consumo de iodo. As regiões de alto consumo de iodo apresentaram maior

prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> quando comparadas às regiões de baixo consumo (69% vs 53%;  $P = 0,0001$ ), achado compatível com a taxa de prevalência observada no presente estudo. Recentemente, com intuito de avaliar o *status* nutricional de iodo no Estado da Bahia, o LET/ICS mensurou os níveis de iodo em amostras de urina de 1369 crianças de escolas públicas baianas (CAMPOS, 2014b). Em Salvador, houve predominância de iodúria na faixa correspondente a 200-299 $\mu$ g/L, indicando nutrição excessiva de iodo entre as crianças da capital baiana (CAMPOS, 2014b). Extrapolando este achado para a população adulta, o excesso do consumo de iodo poderia explicar a elevada taxa de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT de pacientes residentes em Salvador. Até o momento, os mecanismos moleculares por trás da influência do alto consumo de iodo na ocorrência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em células foliculares tireoidianas ainda precisam ser elucidados. Especula-se que poderiam envolver provável ação nociva do processo natural de oxidação do iodo pela célula tireoidiana, propiciando danos e/ou reparação ineficiente do DNA e favorecendo a ocorrência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> (GUAN et al, 2009). No entanto, como discutido previamente, observam-se baixas taxas de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em estudos conduzidos em São Paulo (OLER; CERUTTI, 2009; DUTENHEFNER, 2011), cidade onde o consumo de iodo ainda é considerado alto (VEIGA et al, 2013; CAMPOS et al, 2014), e onde a incidência do câncer de tireoide é mais elevada quando comparado a outras regiões brasileiras (COELI et al, 2005). Portanto, tendo em vista os achados contraditórios, faz-se necessária a condução de estudos voltados para a investigação da associação entre consumo de iodo e ocorrência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT na população brasileira. Estabelecimento do alto consumo de iodo como fator de risco para a mutação BRAF<sup>V600E</sup> poderá fornecer explicação para a associação do aumento da ingestão de iodo com a incidência de CPT observada em muitos estudos epidemiológicos (FRANCESCHI, 1998; KNOBEL; MEDEIROS-NETO, 2007; VEIGA et al, 2013).

Outra questão a ser considerada é a possibilidade da subestimação, dependente de metodologia, da real prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup>. A aplicação de uma variedade de métodos para detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> também poderia explicar as diferentes taxas de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> observadas na literatura, uma vez que apresentam diferentes taxas de sensibilidade. Assim como o presente trabalho, grande parte dos estudos emprega a técnica de sequenciamento direto para a detecção da mutação (ABROSIMOV et al, 2007; NAKAYAMA et al, 2007; FRASCA et al, 2008; GUAN et al, 2009; MOON, H. J. et al, 2009; CHAKRABORTY et al, 2012; KIM, S. J. et al, 2012). Sequenciamento direto é um método

padrão-ouro para identificação de alterações genéticas, uma vez que permite a observação de outras variantes durante a leitura das sequências. Na meta-análise de Xin Liu e colaboradores (2014), a prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT observada nos estudos que aplicaram o método variou entre 34,1% a 73,4%. Apesar da ampla aplicação da técnica, sequenciamento direto apresenta algumas limitações técnicas. Sapio e colaboradores (2006) observaram que o sequenciamento direto de produtos da PCR apresentou-se como um método menos sensível na detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em tecido parafinado. O método foi capaz de detectar a mutação BRAF<sup>V600E</sup> apenas em amostras que continham mais de 40% das células albergando a mutação (SAPIO et al, 2006). Sequenciamento direto é capaz de realizar a leitura de sequência de DNA do tipo selvagem presente na amostra, portanto leituras incorretas podem ocorrer caso a quantidade de DNA do tipo selvagem exceder consideravelmente a quantidade de DNA mutante (SHACKELFORD et al, 2004). A possibilidade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> não estar presente em todas as células tumorais foi investigada por Guerra e colaboradores (2012), que constataram que ocorrência clonal da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT não é frequente e que a maioria considerável dos tumores papilíferos consiste de uma mistura de células que albergam ou não a mutação BRAF<sup>V600E</sup>. Polimorfismo de conformação de fita simples (*single strand conformation polymorphism*; SSCP) é outro método também bastante empregado na detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT. Na meta-análise de Xin Liu e colaboradores (2014), os estudos que utilizaram esta técnica observaram prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> que variava entre 33,5% a 43,8% (RIESCO-EIZAGUIRRE et al, 2006; LUPI et al, 2007; ELISEI et al, 2008; SYKOROVA et al, 2010). No entanto, Sapio e colaboradores (2006) também constaram sensibilidade reduzida similar do método para detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em tumores parafinados. Os autores observaram que a técnica de amplificação de alelo mutante específica (*mutant allele-specific PCR amplification*; MASA) demonstrou ser específica e mais sensível, capaz de detectar a mutação BRAF<sup>V600E</sup> em concentrações abaixo de 20% de células acometidas (SAPIO et al, 2006), no entanto, ainda não houve outros estudos que exploraram a sua aplicação clínica.

Outra alternativa para detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> é a utilização de métodos de imunohistoquímica (IHQ), amplamente utilizados na detecção de proteínas em tecidos parafinados para fins diagnósticos. Recentemente, Capper e colaboradores (2011) desenvolveram um anticorpo monoclonal, denominado VE1, capaz de identificar a proteína BRAF mutada na lâmina citológica de nódulos e de tecidos tumorais, inclusive em amostras provenientes de tecidos parafinados. Análises genéticas e de IHQ foram realizadas em cortes

histológicos de 47 casos de metástases de melanoma e 21 casos de CPT com intuito de investigar a acurácia do clone VE1 para identificação da proteína BRAF<sup>V600E</sup> (CAPPER et al, 2011). Reação de IHQ foi considerada positiva quando não houve ambiguidade na marcação citoplasmática, tais como coloração difusa fraca, qualquer tipo de marcação nuclear isolada, coloração fraca de células intercaladas únicas e marcação de monócitos/macrófagos (CAPPER et al, 2011). Foi observado que o clone VE1 detectou todos os casos de melanoma e CPT BRAF<sup>V600E</sup> positivos (36%; 25/68) e negativos, sendo capaz, inclusive, de identificar o *status* mutacional do gene *BRAF* entre os casos em que a análise por sequenciamento direto foi ineficiente (CAPPER et al, 2011). Outros estudos subsequentes confirmaram a acurácia do VE1 para detecção da proteína BRAF mutada em células tumorais (KOPEREK et al, 2012; ROUTHIER et al, 2013; ZAGZAG et al, 2013; ILIE et al, 2014). Aliado às taxas de sensibilidade e especificidade elevadas apresentadas pelo método, a técnica de IHQ em tecidos previamente fixados em formalina pode permitir o acesso do *status* mutacional de amostras inadequadas para análise genética, como amostras contendo poucas células tumorais ou apresentando fragmentação de DNA.

Outra vantagem atribuída à IHQ se encontra na possibilidade de averiguar o perfil de expressão da proteína BRAF mutada através da intensidade da coloração e contagem de células marcadas, geralmente expressa em porcentagem (FENG et al, 2010; CAPPER et al, 2011). Baseado nestes aspectos, diversos estudos buscaram investigar a aplicação prognóstica da superexpressão da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT. Feng e colaboradores (2010) observaram que superexpressão da proteína BRAF mutada em CPT esteve associada com presença de metástases linfonodais ( $P = 0,019$ ) e superexpressão de genes envolvidos na proliferação celular (*proliferating cell nuclear antigen; PCNA*) ( $P = 0,000$ ) e na regulação do reparo de erros da replicação do DNA (*human muts homolog 2; hMSH2*) ( $P = 0,0019$ ). Contudo, este estudo foi limitado pelo baixo ponto de corte adotado na determinação de superexpressão ( $\geq 10\%$  das células marcadas na reação) (FENG et al, 2010). No estudo de Silva (2012), superexpressão da mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi determinada pela coloração de  $\geq 50\%$  células tumorais e esteve associada com EET ( $P = 0,0183$ ) e metástase à distância ( $P = 0,0001$ ). Estudos sugerem que a amplificação gênica, evento comum em alguns tumores (ALBERTSON, 2006), propicia a superexpressão da proteína BRAF e pode ser um mecanismo de ativação do gene *BRAF* em CPT (CIAMPI; ZHU; NIKIFOROV, 2005; XING, 2013). Investigação da superexpressão da proteína BRAF em amostras histológicas poderia adotada como ferramenta auxiliar prognóstica na avaliação do CPT.

A contaminação de amostras tumorais por células oriundas do tecido normal adjacente representa outro fator a ser considerado uma vez que pode dificultar a detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> quando essas estão presentes em grande quantidade. Alguns estudos empregaram a técnica de microdissecção de captura a *laser* (MCL), visando evitar resultados falso-negativos, e observaram prevalências que variaram entre 39% a 62% (GIANNINI et al, 2007; LUPI et al, 2007; FRASCA et al, 2008; GUERRA et al, 2012; ZHENG, X. et al, 2012). A técnica de MCL aumenta a sensibilidade na identificação de DNA mutante na presença de DNA do tipo selvagem, considerando que a amostra obtida conteria quase que exclusivamente células tumorais (ESPINA et al, 2006).

Devido à desvantagem dos estudos retrospectivos com tecido parafinado, outros também optaram pela utilização de tecido fresco para detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup>. Xin Liu e colaboradores (2014) observaram taxas de prevalências mais elevadas da mutação BRAF<sup>V600E</sup>, que variaram entre 47% a 79% em estudos que não utilizaram tecido parafinado. A vantagem do emprego do tecido fresco em detrimento dos tecidos emblocados em parafina na pesquisa molecular reside no fato de que aqueles são submetidos a tratamentos agressivos que fragmentam o DNA a ser extraído, levando a maior dificuldade de amplificação da sequência de interesse, como discutido previamente (SCORSATO; TELLES, 2011; SENGUVEN et al, 2014).

Após avaliação dos fatores que podem subestimar ou superestimar a taxa de prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> na população do presente estudo, e, principalmente, pelo fato da taxa de prevalência ser similar à observada em outros estudos semelhantes, foi considerado que a frequência observada da mutação aproximou-se da real.

Em relação às análises de associação da positividade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e aspectos clinicopatológicos do CPT, quando avaliadas as idades dos pacientes no momento do diagnóstico, foi constatado que a maioria dos casos incluídos no estudo possuía idade superior a 21 anos, mas 5 casos foram relatados em pacientes pediátricos e adolescentes. O CDT é um evento raro durante a infância e adolescência (RIVKEES et al, 2011; VAISMAN; CORBO; VAISMAN, 2011). No presente estudo, embora não houvesse significância estatística na análise multivariada, casos de pacientes com idade inferior a 21 anos foram mais frequentes no grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo. Apenas um paciente pediátrico apresentou a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (20%; 1/5). Este achado é consistente com dados já reportados que apontam que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> é menos frequente em CPT pediátrico. Estudos de Kumagai e colaboradores (2004) e Penko e colaboradores (2005) não constataram a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em

pacientes pediátricos (0/15 e 0/14, respectivamente). Rosenbaum e colaboradores (2005) investigaram a prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em 24 casos de pacientes jovens ( $\leq 18$  anos) com CPT e observaram que a mutação foi significativamente mais frequente na população adulta (20% vs 77%;  $P = 0,0001$ ), achado consistente com o presente estudo. Aparentemente, rearranjos *RET/PTC* são as alterações genéticas presentes no CPT que ocorrem com mais frequência na infância e geralmente estão associados à exposição à radiação (NIKIFOROVA et al, 2004; SANTORO; MELILLO; FUSCO, 2006).

Baixa prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em crianças e adolescentes remete ao fato de que, embora os tumores papilíferos pediátricos muitas vezes possuam fenótipo agressivo em sua apresentação inicial, geralmente apresentam prognóstico favorável e raramente recorrem, sobretudo após terapêutica adequada (DEMIDCHIK et al, 2006; RIVKEES et al, 2011; VAISMAN; CORBO; VAISMAN, 2011; PARK, S. et al, 2013). Elevada taxa de cura apresentada pelas crianças se deve, em parte, ao fato que os tumores pediátricos geralmente são bem diferenciados e sensíveis ao tratamento com radioiodo. Avidéz das células tireoidianas neoplásicas ao radioiodo depende da atividade e funcionamento do sistema de metabolismo do iodo (NILSSON, 2001). Para tanto, o receptor de TSH (TSHR) exerce papel fundamental, regulando moléculas envolvidas neste sistema. Este processo também envolve o simportador de sódio-iodeto (*sodium-iodine symporter*; NIS) presente na membrana basal, que permite o influxo de iodo para a célula tireoidiana. Uma vez transportado para o folículo tireoidiano, o iodo é oxidado pela tireoperoxidase (TPO) e incorporado a resíduos de tirosina para formação dos hormônios tireoidianos. Expressão dos genes *NIS*, *TPO* e *TSHR* geralmente se encontram comprometidos ou ausentes no CDT (SHEILS; SWEENEY, 1999; ARTURI et al, 2001). Interessantemente, a mutação BRAF<sup>V600E</sup> já foi associada com supressão da expressão destes genes, especialmente o gene responsável pela expressão do NIS (DI CRISTOFARO et al, 2006; RIESCO-EIZAGUIRRE et al, 2006; DURANTE et al, 2007; LIU, D. et al, 2007). Quando se avalia somente o CDT pediátrico, que raramente alberga a mutação BRAF<sup>V600E</sup>, dados na literatura indicaram que tumores pediátricos expressam níveis mais elevados do *NIS* quando comparado à população adulta (MIAN et al, 2001; RINGEL et al, 2001; PATEL et al, 2002). Dessa forma, sugere-se que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT pediátrico poderia propiciar a perda da avidéz ao radioiodo, resultando na falha do tratamento e piora da taxa de sobrevida ao favorecer desdiferenciação (KUMAGAI, 2006; OLER et al, 2008). No entanto, há estudos que não demonstraram associação da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com agressividade tumoral na população pediátrica (SASSOLAS et al, 2012; HENKE et al, 2014). Em estudo retrospectivo recente,

Givens e colaboradores (2014) investigaram a associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e aspectos clinicopatológicos do CPT em 19 pacientes com idade inferior a 18 anos. Não foi observada associação com características de agressividade tumoral, tais como tamanho tumoral, EET, invasão vascular e metástase à distância (GIVENS et al, 2014). No presente estudo, risco aumentado de recorrência tumoral (intermediário ou alto) foi observado somente nos pacientes pediátricos BRAF<sup>V600E</sup> negativos (4/5 casos). Dados conflitantes podem ser resultado do pouco número de casos investigados, de modo que ainda são necessários mais estudos para estabelecer o papel da mutação BRAF<sup>V600E</sup> no prognóstico do CDT pediátrico.

Em relação à população adulta do estudo, todos os pacientes com idade avançada ( $\geq 45$  anos) apresentaram a mutação BRAF<sup>V600E</sup>. Sendo assim, a média de idade dos pacientes BRAF<sup>V600E</sup> positivos observada foi significativamente maior em relação aos pacientes negativos para a mutação ( $40,96 \pm 13,69$  vs  $29,73 \pm 10,18$ ;  $P = 0,008$ ). Zuo e colaboradores (2007) observaram que a presença da mutação esteve significativamente associada à idade igual ou superior 45 anos ( $78\%$  vs  $42\%$ ;  $P = 0,0362$ ) ao investigarem a associação entre a mutação e aspectos clinicopatológicos em 42 pacientes com CPT. O mesmo achado foi observado em estudo de maior casuística, onde Weibin Wang e colaboradores (2012) observaram diferenças significativas nas médias de idade de 208 pacientes com CPT com e sem a mutação BRAF<sup>V600E</sup> ( $46,0 \pm 12,5$  vs  $40,9 \pm 11,9$ ;  $P = 0,004$ ). Diversos outros estudos confirmam este achado (ABROSIMOV et al, 2006; NAKAYAMA et al, 2007; KOPEREK et al, 2012; ULISSE et al, 2012), mas recentes meta-análise não observaram associação entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e idade superior a 45 anos (LI, C. et al, 2012; LIU, X. et al. 2014). No presente estudo, análise multivariada não apontou associação positiva significativa entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e idade avançada (OR: 1,87;  $P = 0,998$ ).

No presente estudo, a maioria dos pacientes com CPT pertenciam ao sexo feminino (40/43; 93%). Quando avaliada a frequência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> entre os sexos dos pacientes, 62,5% das mulheres (25/40) e os únicos três pacientes do sexo masculino incluídos no estudo pertenciam ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo. Tae Yong Kim e colaboradores (2006) observaram associação positiva entre o sexo masculino e a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em 203 pacientes com CPT (21% vs 6%;  $P = 0,006$ ). Ainda, foi observado em meta-análise de 2012 maior chance para o sexo masculino de apresentar a mutação BRAF<sup>V600E</sup> quando comparado ao sexo feminino (OR: 1,22; IC 95%: 1.05–1.41) (LI, C. et al, 2012). Apesar destes achados, não foi observada tal associação no presente estudo, mas o número de pacientes avaliados ainda é restrito para permitir qualquer conclusão. A relação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e o sexo



masculino ainda permanece controversa, uma vez que há diversos estudos que não reportaram associação entre as condições (ELISEI et al, 2008; BASOLO et al, 2010; HOWELL et al, 2011; KIM, S. J. et al, 2012). Ainda deve-se considerar que associação entre o sexo masculino e agressividade tumoral também é controversa. Variados estudos clínicos reportaram que pacientes do sexo masculino tendem a apresentar CPT mais agressivos quando comparados aos tumores apresentados pela população feminina (MICHELI et al, 2009; ITO et al, 2011; HSIEH et al, 2012; YANG; SHEN; SAKAMOTO, 2013; LIANG et al, 2014). No entanto, outros estudos não evidenciaram efeito prognóstico independente (ELISEI et al, 2010; NILUBOL; ZHANG; KEBEBEW, 2013), de modo que o sexo do paciente ainda não é amplamente utilizado pelos principais sistemas de estratificação de risco de mortalidade por CPT e recorrência (COOPER et al, 2009; AJCC, 2010; ROSARIO et al, 2013).

A maioria dos pacientes incluídos no presente estudo não possuíam história familiar de câncer de tireoide, condição apresentada apenas por seis pacientes (14%; 6/43). Em uma coorte de grande casuística realizada em 1987 e 2004, Ito e colaboradores (2009b) constataram taxa de prevalência de 4,5% (243/6.015) de história familiar de câncer de tireoide em pacientes com CPT. No presente estudo, houve maior proporção de indivíduos com história familiar de câncer de tireoide no grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo quando comparado ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo (17,9% vs 6,7%;  $P = 0,403$ ), no entanto não foi observada associação significativa para este achado. Também utilizando amostras parafinadas, Fernandez e colaboradores (2013) não constataram associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e história familiar de CPT tireoide em estudo retrospectivo com 304 pacientes. De modo geral, as alterações genéticas envolvidas com câncer de tireoide familiar geralmente são germinativas, portanto, é possível que não haja associação entre história familiar e mutação BRAF<sup>V600E</sup> uma vez que esta representa uma mutação somática (CAVACO et al, 2008).

Foi observado que a maioria dos casos correspondia a CPT clássicos (32/43; 74,4%), sendo que a variante folicular foi o segundo tipo histológico mais frequente (8/43; 18,6%). Apesar do pequeno número de pacientes, foram detectados três casos de variantes raras do CPT: variante de células altas, variante oxifílica (oncocítica) e variante trabecular hialinizante. Michels e colaboradores (2007) investigaram a prevalência dos subtipos histológicos do CPT em pacientes tratados e acompanhados de 1960 a 1998 na região de Normandia, França. Dentre diversas variantes, os autores constataram a predominância da forma clássica (74%; 503/674) e baixa frequência da variante de células altas (56/674; 8,3%) e para a variante oncocítica (3,5%; 24/674) (MICHELS et al, 2007). Com número de casos semelhante ao presente estudo,

Calangiu e colaboradores (2014) avaliaram 44 tumores papilíferos e observaram maior frequência para a forma clássica do CPT (68,1%; 30/44), seguida para a variante folicular (25%; 11/44) e variante de células altas (6,8%; 3/44).

Exceto pela variante de células altas, as demais variantes observadas no presente estudo (variante oxifílica e variante trabecular hialinizante) pertenciam ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo. A mutação BRAF<sup>V600E</sup> é comumente associada à forma clássica e à variante de células altas, e menos observada em variante folicular (KEBEBEW et al, 2007; LI, C. et al, 2012; VIRK et al, 2013). No presente estudo, o grupo de tumores BRAF<sup>V600E</sup> positivos apresentaram maior concentração de tumores na forma clássica quando comparado ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo (82,1% vs 60%). Por sua vez, o grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo apresentou mais casos da variante folicular (10,7% vs 33,3%). Embora possa se apresentar como tumores grandes e invasivos, o prognóstico a longo prazo dos tumores papilíferos de variante folicular geralmente é similar ao apresentado pelos CPT clássicos, (PASSLER et al, 2003; ZIDAN et al, 2003; BURNINGHAM et al, 2005; LANG et al, 2006; SALAJEGHEH et al, 2008). Em estudo de casos consecutivos, Adeniran e colaboradores (2006) observaram que mutações pontuais no gene *RAS* foram mais frequentes em CPT de variante folicular que alterações no gene *BRAF* e rearranjos *RET/PTC* (82,3%; 14/17). Trovisco e colaboradores (2004) evidenciaram, inclusive, a presença de uma mutação incomum no gene *BRAF*, que substitui uma lisina por um ácido glutâmico no resíduo 601 (BRAF<sup>K601E</sup>). Provavelmente, devido à baixa atividade cinase da BRAF<sup>K601E</sup> quando comparado à BRAF<sup>V600E</sup> (DAVIES, H. et al, 2002; WAN et al, 2004), esta mutação geralmente esteja associada a comportamento clínico menos agressivo do CPT (BAROLLO et al, 2014). No presente estudo, nenhum caso de variante folicular apresentou a mutação BRAF<sup>K601E</sup>. A meta-análise de Carol Li e colaboradores (2012) evidenciou associação negativa entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e CPT de variante folicular (OR: 0,23; IC 95%: 0,61 - 0,34), sugerindo possível papel protetor da variante em apresentar a mutação.

Ito e colaboradores (2008b) investigaram as variantes histológicas apresentadas por 1521 pacientes com CPT e observaram prevalência de 1,9% de casos de variante oxifílica (29/1521). Estudos apontam que a variante oxifílica também possui prognóstico similar ao CPT clássico (BECKNER et al, 1995; BERHO; SUSTER, 1997; ITO et al, 2008b). No presente estudo, o paciente que apresentou CPT de variante oxifílica possuiu tumor maior que 40 mm. Trovisco e colaboradores (2004) identificaram a mutação BRAF<sup>V600E</sup> em 6 de 11 casos de CPT de variante oxifílica que possuíam padrão de crescimento predominantemente papilífero (54,4%; 6/11). Em contrapartida, neste mesmo estudo, os casos de CPT de variante oxifílica

com padrão de crescimento unicamente folicular não apresentaram a mutação BRAF<sup>V600E</sup>, mas 3 dos 4 casos apresentavam a mutação BRAF<sup>K601E</sup> (TROVISCO et al, 2004). Achado similar foi reportado por Musholt e colaboradores (2008), que observaram que tumores papilíferos de variante oxiflica com padrão de crescimento folicular não apresentaram a mutação BRAF<sup>V600E</sup>. Baseado nestes achados, é possível que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> contribua mais vigorosamente para o desenvolvimento de tumores de arquitetura predominantemente papilífera (KNAUF et al, 2005).

Variante trabecular hialinizante do CPT é considerada uma lesão muito rara e controversa, uma vez que geralmente comporta-se como lesão de natureza mais indolente (CARNEY et al, 2008; NOSÉ; VOLANTI; PAPOTTI, 2008). A variante já foi associada à presença de rearranjos RET/PTC (CHEUNG et al, 2000). Em relação a mutações no gene *BRAF*, inicialmente os estudos não reportavam a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT de variante trabecular hialinizante (TROVISCO et al, 2004; SALVATORE et al, 2005; FERNANDEZ et al, 2013). Contudo, assim como no presente estudo, Baloch e colaboradores (2006) identificaram a mutação BRAF<sup>V600E</sup> em um caso de CPT de variante trabecular hialinizante, mas não em neoplasia hialinizante trabecular. O achado sugere que a detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> também poderia auxiliar na distinção entre lesões benignas e malignas de natureza trabecular hialinizante, mas os autores ainda sugerem cautela na confirmação diagnóstica uma vez que a ausência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> não implica em absoluta benignidade (BALOCH et al, 2006).

Não houve influência significativa da presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> no tamanho tumoral dos pacientes do estudo. A média, em milímetros, do tamanho tumoral apresentado pelos pacientes foi semelhante entre os grupos BRAF<sup>V600E</sup> positivo e negativo ( $20,1 \pm 12,32$  vs  $17,6 \pm 9,51$ ;  $P = 0,497$ ). Outros estudos reportaram associação positiva significativa entre o tamanho tumoral e positividade para a mutação BRAF<sup>V600E</sup>. Na meta-análise de Carol Li (2012), foi observado que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> esteve associada significativamente com tumores maiores que 10 mm (OR: 1,57; IC 95% 1,29 – 1,92). No presente estudo, onze casos (25,6%; 11/43) foram microcarcinomas papilíferos, e a maioria dos casos restantes não ultrapassavam o tamanho de 20 mm (48,8%; 21/43), contribuindo para a obtenção de médias de tamanho tumorais relativamente mais baixas. Somente foram incluídos no estudo microcarcinomas papilíferos com subtipos histológicos raros ou que apresentavam qualquer uma das seguintes características clinicopatológicas: estágio clínico avançado (III/IV); EET; metástases linfonodais; e à distância. A mutação BRAF<sup>V600E</sup> foi também frequentemente

detectado em microcarcinomas papilíferos, sugerindo possível papel oncogênico precoce no desenvolvimento do CPT (UGOLINI et al, 2007). A prevalência da mutação BRAF<sup>V600E</sup> observada no grupo de microcarcinomas do presente estudo foi de 63,6% (7/11), similar à prevalência observada em tumores maiores de 10 mm (65,6%; 21/32). Em contraste, Ito e colaboradores (2009) observaram prevalência significativamente menor da mutação BRAF<sup>V600E</sup> entre os microcarcinomas em relação aos tumores maiores que 10 mm incluídos em seu estudo (28,2% (31/110) vs 40,5% (211/521);  $P = 0,0175$ ). O fato do presente estudo incluir casos de microcarcinoma com maior agressividade pode ter contribuído para a taxa de prevalência elevada da mutação BRAF<sup>V600E</sup> neste subgrupo. No entanto, como discutido previamente, a utilização do sequenciamento direto como técnica de detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e a dissecação manual de tecido parafinado contendo células normais pode também ter potencialmente contribuído para redução da prevalência observada no estudo (ITO et al, 2009). Choi e colaboradores (2013) observaram a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em 71,3% casos de microcarcinoma papilífero (72/101) ao empregar a PCR em tempo real, técnica mais sensível que a PCR convencional para amostras de tecido parafinado (HALAIT et al, 2012; JEONG et al, 2013).

Diversos estudos investigaram a associação da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com aspectos clinicopatológicos em microcarcinomas papilíferos. Xiaolong Lee e colaboradores (2009) investigaram as características clínicas e patológicas de 64 microcarcinomas papilíferos e observaram que os tumores que possuíam a mutação BRAF<sup>V600E</sup> apresentaram características relacionadas à invasão, tais como EET, metástase linfonodal e estágio clínico avançado. Em estudo de maior casuística, Basolo e colaboradores (2010) investigaram tumores  $\leq 20$  mm de pacientes com CPT a fim de correlacionar a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> com aspectos clinicopatológicos. A mutação BRAF<sup>V600E</sup> esteve associada com tumores de maior extensão (52% vs 39,6%;  $P = 0,0001$ ). Apesar de dados ainda controversos, é possível que a detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em microcarcinomas papilíferos possa contribuir para a identificação de tumores com comportamento clínico mais invasivo.

No presente estudo, 23 pacientes apresentaram tumores multifocais (53,4%; 23/43;), sendo 21 casos (91,3%; 21/23) apresentando bilateralidade. Na Coreia do Sul, Hwa Young Ahn e colaboradores (2014) observaram que a maioria dos tumores multifocais apresentava-se em ambos os lobos tireoidianos (67%; 57/85). No entanto, a maioria dos estudos observou que tumores multifocais bilaterais ocorrem com menos frequência em relação aos tumores unilaterais (KARATZAS et al, 2013; HE et al, 2014). Em estudo retrospectivo, Mazeh e

colaboradores (2011) observaram que multifocalidade esteve presente em 57% dos casos (150/289), nos quais 44,6% (67/150) apresentaram-se como tumores bilaterais. Em outro estudo retrospectivo, Hwang e colaboradores (2010) observaram taxa de prevalência ainda menor: em 592 pacientes com CPT, 13,2% apresentaram tumores bilaterais (78/592). No presente estudo, assim como no estudo de Ahn e colaboradores (2014), o número de casos avaliados é limitado, de modo que pode ter dificultado a estimativa real prevalência de bilateralidade.

Embora não tenha sido observado diferença estatística na distribuição dos casos, o grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo apresentou mais casos de multifocalidade quando comparado ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo (57,1% vs 46,7%;  $P = 0,512$ ). Kurtulmus e colaboradores (2012) observaram que, em 109 pacientes com CPT, a mutação BRAF<sup>V600E</sup> esteve positiva e significativamente associada com multifocalidade (52,3% vs 47,7%;  $P = 0,02$ ). Contudo, alguns estudos não observaram associação positiva entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e multifocalidade (LIU, D. et al, 2005; SAPIO et al, 2006; GOUTAS et al, 2008; BOMMARITO et al, 2011; KANG et al, 2013). Tendo em vista a discrepância observada, So Yeon Park e colaboradores (2006) realizaram um estudo de clonalidade pelo qual analisaram múltiplos focos de CPT de 61 pacientes e observaram que 39,3% dos casos não apresentavam a mutação BRAF<sup>V600E</sup> em todos os focos tumorais, sugerindo que focos tumorais podem corresponder a múltiplos tumores primários independente da mutação. Portanto, é possível que heterogeneidade intratumoral da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT seja um fator a ser considerado na detecção e análise da taxa de prevalência tumoral, principalmente se a amostra tumoral obtida for composta majoritariamente de múltiplos focos tumorais BRAF<sup>V600E</sup> negativos.

Houve metástases para os linfonodos em 41,9% dos pacientes do presente estudo (18/43). Metástases linfonodais são comuns em pacientes com CPT na sua apresentação clínica inicial (COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Meta-análises têm demonstrado associação positiva significante entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e metástase para os linfonodos (LI, C. et al, 2012; LIU, X. et al, 2014). Embora a distribuição dos pacientes não tenha sido estatisticamente significativa, no presente estudo o grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo curiosamente apresentou menos casos de metástases linfonodais quando comparado ao grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo (39,3% vs 46,7%;  $P = 0,751$ ). Zoghliami e colaboradores (2014) reportaram o mesmo achado em 46 pacientes com CPT, observando que a presença de metástases para os linfonodos cervicais ocorreu com menos frequência entre os pacientes BRAF<sup>V600E</sup> positivos quando comparados aos pacientes BRAF<sup>V600E</sup> negativos (3/17; 17,6% vs 14/17; 82,5%;  $P = 0,03$ ). Contudo, o número de pacientes avaliados foi muito reduzido em ambas análises. Importa

considerar que a presença de pacientes jovens no grupo amostral pode ter contribuído para a associação negativa observada entre metástase linfonodal e mutação BRAF<sup>V600E</sup> uma vez que o CPT pediátrico geralmente apresenta metástases linfonodais em sua apresentação inicial, e, principalmente, raramente apresenta mutações no gene *BRAF*.

A existência de poucos casos de EET, invasão vascular e metástase à distância no presente estudo impossibilitou a análise destas importantes variáveis. Até o momento, todos os casos identificados de EET (7%; 3/43) e invasão vascular (7%; 3/43) pertenceram ao grupo BRAF<sup>V600E</sup>. No entanto, os únicos dois casos de metástases à distância (pulmões) foram igualmente distribuídos entre os grupos BRAF<sup>V600E</sup> positivo e negativo. Meta-análises reportam forte associação entre EET e presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> (LI, C. et al, 2012, LIU, X., 2014).

Desde a primeira constatação de possível correlação entre TH e CPT (DAILEY; LINDSAY, SKAHEN, 1955), muitos estudos buscaram investigar essa associação. Em uma corte de grande casuística, Ling Zhang e colaboradores (2012) observaram que pacientes com TH apresentaram risco mais elevado de desenvolver CPT quando comparados aos pacientes sem TH. Tireoidite de Hashimoto representa uma doença autoimune benigna constituída por inflamação crônica que afeta a glândula tireoide (HIROMATSU; SATOH; AMINO, 2013). Esta promove depleção progressiva de células tireoidianas, que são substituídas gradualmente por infiltrado mononuclear e fibrose. Além disso, o tecido parenquimal é progressivamente comprometido e substituído por infiltrado inflamatório que produz fatores de crescimento proangiogênicos, citocinas, quimiocinas e enzimas degradadoras de matriz extracelular no tecido tireoidiano (PACIFICO; LEONARDI, 2010; TOMER; MENCONI, 2013). Os mecanismos imunológicos e moleculares envolvidos que incidem na associação entre TH e CPT ainda permanecem incertos. Ward (2014) publicou uma revisão recente que discute os possíveis fatores moleculares envolvidos nesta associação. Inflamação crônica *per se* poderia propiciar a ocorrência dos rearranjos em células foliculares tireoidianas através da ação de citocinas, quimiocinas e radicais livres, que causam danos teciduais e no material genético (GUARINO, 2010). Rearranjos *RET/PTC* são alterações genéticas já reportadas em lesões benignas tireoidianas, inclusive em TH (WIRTSCHAFTER et al, 1997; SHEILS et al, 2000; ELISEI et al, 2001). Muzza e colaboradores (2010) observaram que em 443 casos de CPT o rearranjo *RET/PTC1* esteve presente em 41% das células não-neoplásicas acometidas pela TH que circundavam os tumores, além de estar mais presente em casos de CPT associado a TH, enquanto, por sua vez, a mutação BRAF<sup>V600E</sup> representou mais casos de CPT sem a

comorbidade. Associação positiva entre TH e o RET/PTC1 remete provável papel oncogênico desta alteração genética no desenvolvimento de CPT em casos de TH (SANTORO; MELILLO; FUSCO, 2006). No presente estudo, presença de TH associado ao tumor foi significativamente menos frequente no grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo em relação ao grupo negativo (25% vs 66,7%;  $P = 0,008$ ). Ainda, associação negativa entre TH e a mutação BRAF<sup>V600E</sup> também observada na análise multivariada (OR: 0,14;  $P = 0,024$ ) sugere que a doença possa exercer efeito protetor na ocorrência da mutação em CPT. Outros estudos reportaram o mesmo achado, observando que a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> é menos frequente em pacientes com CPT e TH associada (KIM, K. H, 2005; KIM, S. K., 2009; KIM, S. J., 2014). Diante deste contexto, o processo autoimune da TH *per se* ou a ocorrência de rearranjos RET/PTC poderiam ser suficientes para promover a oncogênese tireoidiana independente da mutação BRAF<sup>V600E</sup>.

Diversos estudos têm reportado que esta concomitância indica prognóstico favorável para os pacientes, com doença menos agressiva na apresentação inicial e reduzida taxa de recorrência (DVORKIN et al, 2013; MAROTTA et al, 2013; KIM, S. J., 2014b). Por outro lado, outros estudos têm argumentado que o prognóstico do CPT não é afetado pela TH detectada no exame anatomopatológico (DEL RIO et al, 2008; JANJOVIC; LE; HERSHMAN et al, 2013). Dado o prognóstico negativo do CPT geralmente atribuído à mutação BRAF<sup>V600E</sup>, alguns estudos investigaram o efeito combinado da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e TH na agressividade do CPT. Após categorizar casos de pacientes com CPT de acordo com o *status* da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e a presença ou não de TH associada, Kim Su-Jin e colaboradores (2014) observaram efeito combinado da presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e ausência de TH sobre estágio clínico avançado (MACIS) e risco aumentado de recorrência, de acordo com a ATA. Ainda, Marotta e colaboradores (2013) reportaram que a infiltração linfocítica promovida pela TH exerceu efeito protetor contra progressão tumoral em casos de CPT, independente do *status* mutacional do gene *BRAF*. Recrutamento de células pró-inflamatórias para o tecido tireoidiano ocorre em resposta à doença autoimune. Apesar da ação das moléculas secretadas durante o processo inflamatório propiciar microambiente favorável para progressão tumoral, macrófagos, linfócitos T e B e células *natural killers* (NK) recrutados durante o processo autoimune também serão direcionados a destruir as células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, infiltração linfocítica intensa poderia explicar a inibição da progressão tumoral uma vez que a resposta antitumoral estaria mais acentuada que a ação de moléculas proinflamatórias e capacidade de evasão da resposta imune.

Um dos focos da avaliação da mutação BRAF<sup>V600E</sup> sobre o prognóstico do CPT tem sido a associação direta da mutação com o estágio clínico tumoral (TNM). Recentes meta-análises apontaram associação positiva entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e estágio clínico avançado (LI, C. et al, 2012; LIU, X. et al, 2014). No presente estudo, todos os seis casos de estágio clínico avançado (III/IV) pertenceram ao no grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo. Em contraste, o grupo BRAF<sup>V600E</sup> negativo era composto apenas por casos de baixo estágio clínico (I/II). Em estudo retrospectivo multicêntrico com casuística de 1849 pacientes com CPT, foi observada significativa associação entre a presença da mutação BRAF<sup>V600E</sup> e mortalidade por CPT ( $P = < 0,001$ ) (XING et al, 2013). Em estudo retrospectivo, Zoghliani e colaboradores (2013) não observaram a associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e variados aspectos clinicopatológicos em 46 pacientes com CPT, incluindo estágio clínico avançado. Este dado é consistente com o achado do presente estudo, onde não foi possível observar associação significativa entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e estágio clínico avançado (III/IV), mas o número de pacientes avaliados ainda é muito limitado. Contudo, uma vez assumida e comprovada associação positiva independente, a mutação BRAF<sup>V600E</sup> possivelmente poderá se inserir como ferramenta útil na identificação de casos de alto risco de mortalidade.

Diversos estudos têm demonstrado que a detecção de mutação BRAF<sup>V600E</sup> pode ser utilizada como marcador prognóstico molecular coadjuvante à estratificação de risco de recorrência tumoral em pacientes com CPT, principalmente àqueles casos inicialmente classificados como baixo risco. Dados reportados na literatura mostraram que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> é frequente em CPT recorrente (HENDERSON et al, 2009; BAROLLO et al, 2010; TUFANO; BISHOP; WU, 2012). No presente estudo, casos com risco intermediário ou alto de recorrência segundo o Consenso Brasileiro foram mais frequentes no grupo BRAF<sup>V600E</sup> positivo (53,5% vs 40%), mas não houve associação significativa ( $P = 0,787$ ). Tendo em vista que a maioria destes pacientes com risco de recorrência foram classificados com estágio clínico baixo (I/II), e que a taxa de sobrevida livre de doença entre pacientes com CPT é considerada alta, a detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> poderia auxiliar de forma significativa na estratificação de risco de recorrência em pacientes convencionalmente classificados com estágio clínico baixo e contribuir para a otimização de protocolos de *follow-up* focados na identificação de recorrência tumoral. Assim, a detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> aliada aos sistemas de estratificação de risco de recorrência convencionais poderia contribuir para o manejo de pacientes com risco elevado de recorrência. Prescott e colaboradores (2012) observaram a incidência de CPT recorrente em uma coorte de 356 pacientes, que foi significativamente maior entre pacientes BRAF<sup>V600E</sup>



positivos quando comparado aos pacientes BRAF<sup>V600E</sup> negativo (OR: 2,62;  $P = 0,02$ ). A utilização, na prática clínica, da detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> associada aos algoritmos adotados pela ATA e pelas categorias dos sistemas de estadiamento AMES, MACIS e TNM otimizou de forma moderada, porém significativa, a estratificação de risco de recorrência (PRESCOTT et al, 2012). Uma vez assumida a importância prognóstica da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT, pacientes que possuem a mutação possivelmente poderão receber condutas terapêuticas e de seguimento clínico mais intensificados.

No contexto observado no presente estudo e pelos diversos estudos clínicos e epidemiológicos que investigaram a mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT, o papel prognóstico da mutação ainda permanece controverso. Discrepâncias dos dados apresentados na literatura dificulta a aplicação rotineira da detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> na prática clínica, de modo que ainda não é recomendada para estratificação prognóstica (COOPER et al, 2009; ROSARIO et al, 2013). Como discutido previamente, diversas razões podem ser atribuídas à falta de evidências clínicas mais robustas, tais como a faixa etária dos pacientes avaliados, a heterogeneidade dos subtipos histológicos apresentados e o número reduzido de casos avaliados.

Poucos estudos em CPT avaliaram a associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e etnia. Meta-análise de Ju-han Lee (2007) apontou que não há associação significativa entre raça e positividade da mutação BRAF<sup>V600E</sup> ( $P = 0,598$ ). No entanto, o estudo é limitado pois somente avaliou a associação entre populações caucasianas e asiáticas (LEE et al, 2007). Diferenças étnicas e geográficas são fatores que também devem ser considerados, uma vez que fatores genéticos e ambientais podem influenciar diferentes expressões fenotípicas. A população brasileira é bastante miscigenada e formada por grupos étnicos variados: caucasianos, negros, asiáticos e indígenas. Em estudo conduzido na cidade de São Paulo, Oler e Cerutti (2009) observaram que a mutação BRAF<sup>V600E</sup> esteve associada com algumas características associadas com CPT agressivo, tais como tamanho tumoral, EET, metástase linfonodal e risco aumentado de recorrência. No presente estudo, não foi observada associação significativa entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e agressividade tumoral. Ainda que os dados representem um número reduzido de casos de CPT, a possibilidade de que a discrepância seja real não deve ser descartada, uma vez que a população paulista difere da população baiana, que é majoritariamente composta por negros e pardos.

Segundo meta-análise de Xin Liu e colaboradores (2014), a maioria dos estudos que refutou a associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e agressividade tumoral foi estudos

conduzidos em países asiáticos, que, inclusive, reportaram elevada prevalência da mutação em CPT. Como discutido previamente, populações asiáticas são reconhecidas pelo alto consumo de iodo na alimentação. Ainda há poucos estudos publicados que investigaram o papel deste mineral na agressividade do CPT. Em estudo conduzido com linhagem de células tireoidianas, Fuziwara e Kimura (2014) reportaram que a proteína BRAF<sup>V600E</sup> ativa indiretamente *miR*-19-72, grupo de microRNAs capazes de suprimir a expressão de TGFβ na célula tumoral, através da ativação de sinalização Notch. Tratamento destas células com níveis elevados de iodo reduziu os efeitos oncogênicos da proteína BRAF<sup>V600E</sup> ao bloquear a superexpressão do *miR*-19-72 e ativação via Notch, culminando no restabelecimento da antiproliferativa via TGFβ (FUZIWARA; KIMURA, 2014). Estudo prévio já havia constatado a ativação da via Notch regulada pela proteína BRAF<sup>V600E</sup> em câncer de tireoide, sendo inclusive associada à proliferação tumoral (YAMASHITA et al, 2013). Tendo em vista que a via Notch já foi associada com iniciação e progressão tumoral em tumores ósseos (SETHI; KANG, 2011), o efeito protetor de níveis elevados de iodo na ação da proteína BRAF<sup>V600E</sup> sobre a via Notch poderia explicar a associação nula entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e CPT agressivo encontrada nos estudos que avaliaram populações asiáticas. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer o efeito do iodo na agressividade tumoral do CPT *in vitro* e *in vivo*.

Diferenças socioeconômicas entre as populações estudadas também poderiam justificar as discrepâncias nos dados obtidos pelos diferentes estudos. Devido ao aperfeiçoamento do monitoramento e da detecção precoce, pacientes com CPT cada vez mais apresentam nódulos tireoidianos assintomáticos de evolução indolente, diagnosticados incidentalmente pela USG e outros exames de imagem. Portanto, pacientes com CPT incluídos em estudos conduzidos em países que provém a suas populações amplo acesso aos sistemas de saúde tenderão a apresentar tumores menos extensivos no momento do diagnóstico e tratamento inicial. Dessa forma, grande parte destes tumores papilíferos poderá não desenvolver seu caráter mais agressivo. Em contraste, a detecção de tumores clinicamente evidentes e que expressaram fenótipos agressivos pode ser mais frequente em países que possuem um sistema de saúde precário ou mesmo em populações que não têm acesso a atendimento adequado e de qualidade. Houve poucos casos de tumores com mais de 40 mm e que apresentavam invasão vascular, EET e metástases à distância no presente estudo, de modo que não foi possível avaliar a associação entre a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e estes fatores de mau prognóstico. Ainda que o Hospital São Rafael forneça atendimento ao público cadastrado no Sistema Único de Saúde (SUS), a maioria dos pacientes atendidos para o diagnóstico e tratamento do câncer de tireoide pertence

à rede privada. Sendo assim, presume-se que grande parte destes pacientes tiveram fácil acesso ao diagnóstico e tratamento da doença, justificando assim a apresentação de tumores com fenótipos menos agressivo no momento do diagnóstico.

Mesmo diante da possibilidade destas inconsistências enviesarem a definição do papel prognóstico da mutação BRAF<sup>V600E</sup>, não se deve subestimar a hipótese de que a associação da mutação com aspectos prognósticos convencionais do CPT seja apenas indireta ou aparente. Baseado nas evidências de estudos experimentais em linhagem de células e camundongos transgênicos que demonstraram que a iniciação e progressão tumoral pode ser favorecida pela ativação constitutiva da proteína BRAF (KNAUF et al, 2005; MITSUTAKE et al, 2005; RIESCO-EIZAGUIRRE, 2006), ainda sugere-se que a mutação *per se* não seja suficiente para induzir fenótipo agressivo ao CPT. Devido à instabilidade genômica promovida pela expressão da mutação BRAF<sup>V600E</sup> (MITSUTAKE et al, 2005), tem sido considerado que a mutação torna as células tumorais vulneráveis à ocorrência de outros eventos oncogênicos, e, inclusive, à aquisição de alterações genéticas secundárias que podem ativar outras vias de sinalização celular e cooperar na progressão e desdiferenciação tumoral. Quiros e colaboradores (2005) observaram mutações p53 em todos os CAT BRAF<sup>V600E</sup> positivos investigados, sugerindo que o CAT deriva do CPT BRAF<sup>V600E</sup> positivos após aquisição adicional de alterações genéticas no gene *p53*. Mais recentemente, estudos identificaram a ocorrência de mutações pontuais na região promotora do gene *TERT* em câncer de tireoide (LIU, X. et al, 2013; VINAGRE et al, 2013), sendo associada a tumores clinicamente agressivos e de mau prognóstico, principalmente em casos de CPT (MELO et al, 2014). De forma interessante, estudos subsequentes também reportaram que o papel das mutações da região promotora do *TERT* parece requerer e cooperar com alterações genéticas adicionais, por exemplo, com a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (LANDA et al, 2013; LIU, X. et al, 2014b). Xing e colaboradores (2014) observaram que casos de tumores papilíferos que albergavam tanto a mutação BRAF<sup>V600E</sup> quanto mutações *TERT* eram clinicamente mais agressivos e apresentaram maiores taxas de recorrência quando comparados aos tumores que possuíam apenas uma destas alterações genéticas. Dessa forma, há chances que, futuramente, a detecção das mutações *TERT* aliada à detecção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> poderia auxiliar na estratificação prognóstica de pacientes com CPT.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos contextos apresentados, cada vez mais se faz necessário a condução de estudos prospectivos multicêntricos, de grande casuística e bem delineados, com a finalidade de definir o real papel da mutação BRAF<sup>V600E</sup> no prognóstico do CPT.

Dessa forma, a equipe do LET/ICS pretende ampliar a casuística no Hospital São Rafael e firmar parcerias com outras instituições médicas e/ou acadêmicas do Estado da Bahia e de outros Estados. Ainda, sempre que possível, pretende-se priorizar a utilização do tecido fresco como fonte de obtenção do DNA genômico dos pacientes com CPT com intuito de garantir amostras de boa qualidade.

Em relação ao acesso aos tecidos parafinados, cautela deverá ser tomada na verificação da qualidade dos materiais. Haverá a opção da utilização de métodos e *kits* comerciais de extração de DNA específicos para tecidos parafinados e, sempre que possível, a escolha por estratégias de amplificação que possam sobrepor ou reparar amostras de DNA que, por ventura, foram degradadas durante o processamento do tecido parafinado (WGA). Além da análise genética, haverá o interesse de utilizar o método de IHQ para detecção da proteína BRAF mutada, bem como para mensuração do seu grau de expressão através da contagem de células marcadas nas lâminas tratadas com anticorpos.

Pretende-se, ainda, realizar a pesquisa por outras alterações genéticas adicionais que possam estar envolvidas na progressão tumoral e estar presentes durante o evento oncogênico da mutação BRAF<sup>V600E</sup>.

## 10 CONCLUSÕES

- Não houve associação da positividade para a mutação BRAF<sup>V600E</sup> com a maioria dos aspectos clinicopatológicos de CPT investigados.
- A presença de Tireoidite de Hashimoto coexistente com o tumor foi o único fator que, significativamente e de forma independente, apresentou associação de proteção da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em CPT.
- A prevalência observada da mutação BRAF<sup>V600E</sup>, em amostras tumorais analisadas de pacientes com CPT diagnosticados e tratados no Hospital São Rafael, Salvador – Bahia, foi de 65,1%.

## REFERÊNCIAS

- ABROSIMOV, A. et al. Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical BRAF status. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 120, n. 1, p. 196-200, 2007.
- ABU-SALEM, O. T. FNAB thyroid gland: comparison study between pre- and post-operative histological diagnosis. **Arch. Inst. Pasteur Tunis.**, Tunis, v. 80, n. 1-4, p. 57-60.
- ADENIRAN, A. J. et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 30, n. 2, p. 216-222, 2006.
- AHN, D. et al. BRAFV600E mutation does not serve as a prognostic factor in Korean patients with papillary thyroid carcinoma. **Auris Nasus Larynx**, Tokyo, v. 39, n. 2, p. 198-203, 2012.
- AHN, H. Y. et al. Clinical significance of the BRAF V600E mutation in multifocal papillary thyroid carcinoma in Korea. **Surgery**, St. Louis, v. 155, n. 4, p. 689-695, 2014.
- ALBAREL, F. et al. From nodule to differentiated thyroid carcinoma: contributions of molecular analysis in 2012. **Ann. Endocrinol.**, Paris, v. 73, n. 3, p. 155-164, 2012.
- ALBERTS, B. et al. Câncer. In: \_\_\_\_\_. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 1205-1268.
- ALBERTSON, D. G. Gene amplification in cancer. **Trends Genet.** Cambridge, v. 22, n. 8, p. 447-455, 2006.
- ALBORES-SAAVEDRA, J. et al. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype: papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2007.
- AL-BRAHIM, N.; ASA, S. L. Papillary thyroid carcinoma: an overview. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 130, n. 7, p. 1057-1062, 2006.

ALI, A. M. et al. Patient and tumour characteristics, management, and age-specific survival in women with breast cancer in the East of England. **Br. J. Cancer**, London, v. 104, n. 4, p. 564-570, 2011.

ALSANEA, O. et al. Is familial non-medullary thyroid carcinoma more aggressive than sporadic thyroid cancer? A multicenter series. **Surgery**, St. Louis, v. 128, n. 6, p. 1043-1050, 2000.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Thyroid. In: AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **AJCC Cancer Staging Manual**. 7<sup>th</sup> Ed. Chicago: Springer, 2010. p. 89.

AMPHLETT, B. et al. Recent trends in the incidence, geographical distribution, and survival from thyroid cancer in Wales, 1985-2010. **Thyroid**, New York, v. 23, n. 11, p. 1470-1478, 2013.

ANASTASILAKIS, A. D. et al. Papillary thyroid microcarcinoma presenting as lymph node metastasis – a diagnostic challenge: case report and systematic review of literature. **Hormones (Athens)**, Athens, v. 11, n. 4, p. 419-427, 2012.

ARORA, N. et al. Extrathyroidal extension is not all equal: Implications of macroscopic versus microscopic extent in papillary thyroid carcinoma. **Surgery**, St. Louis, v. 144, n. 6, p. 942-947, 2008.

ARTURI, F. et al. Expression pattern of the pendrin and sodium/iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 145, n. 2, p. 129-135, 2001.

ASCHEBROOK-KILFOY, B. et al. Follicular thyroid cancer incidence patterns in the United States, 1980-2009. **Thyroid**, New York, v. 23, n. 8, p. 1015-1021, 2013.

ASIOLI, S. et al. Papillary thyroid carcinoma with hobnail features: histopathologic criteria to predict aggressive behavior. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 44, n. 3, p. 320-328, 2013.

BALDINI, E. et al. Emerging molecular markers for the prognosis of differentiated thyroid cancer patients. **Int. J. Surg.**, London, 2014.

BALOCH, Z. W. et al. Lack of BRAF mutations in hyalinizing trabecular neoplasm. **Cytojournal**, London, v. 3, p. 17, 2006.

BALOCH, Z. W.; LIVOLSI, V. A. Unusual tumors of the thyroid gland. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 297-310, 2008.

BALOCH, Z.; LIVOLSI, V. A.; TONDON, R. Aggressive variants of follicular cell derived thyroid carcinoma; the so called 'real thyroid carcinomas'. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 66, n. 9, p. 733-743, 2013.

BARBARO, D. et al. The BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer with positive or suspected pre-surgical cytological finding is not associated with advanced stages or worse prognosis. **Endocrine**, Houndsmills, v. 45, n. 3, p. 462-468, 2014.

BAROLLO, S. et al. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with (131)I and 2-[(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 163, n. 4, p. 659-663, 2010.

\_\_\_\_\_. Prevalence, tumorigenic role, and biochemical implications of rare BRAF alterations. **Thyroid**, New York, v. 24, n. 5, p. 809-819, 2014.

BASOLO, F. 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.**, Springfield, v. 95, n. 9, p. 4197-4205, 2010.

BEASLEY, N. J. et al. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Chicago, v. 128, n. 7, p. 825-828, 2002.

BECKNER, M. E.; HEFFESS, C. S.; OERTEL, J. E. Oxyphilic papillary thyroid carcinomas. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 103, n. 3, p. 280-287, 1995.

BEGUM, S. et al. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 17, n. 11, p. 1359-1363, 2004.

BENSON, D. A. GenBank. **Nucleic. Acids Res.**, London, v. 41, p. D36-D42, 2013.

BERHO, M.; SUSTER, S. The oncocytic variant of papillary carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 15 cases. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 28, n. 1, p. 47-53, 1997.



BERRES, M. L. et al. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J. Exp. Med. New York*, v. 211, n. 4., p. 669-683, 2014.

BHAJEE, F.; NIKIFOROV, Y. E. Molecular analysis of thyroid tumors. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 126-133, 2011.

BLANCO, C. G.; MATUTE, E. M.; HIDALGO, A. L. Biomarcadores moleculares implicados en el proceso de desdiferenciación tumoral del carcinoma de tiroides de origen epitelial: perspectivas. **Endocrinol. Nutr.**, Barcelona, v. 59, n. 7, p. 452-458, 2012.

BOMMARITO, A. BRAFV600E mutation, TIMP-1 upregulation, and NF- $\kappa$ B activation: closing the loop on the papillary thyroid cancer trilogy. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 18, n. 6, p. 669-685, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Segurança. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro: Flama, 2014.

BRITO, J. P. The accuracy of thyroid nodule ultrasound to predict thyroid cancer: systematic review and meta-analysis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 99, n. 4, p. 1253-1263, 2014.

BRUMMER, T. et al. Functional analysis of the regulatory requirements of B-Raf and the B-Raf(V600E) oncoprotein. **Oncogene**, Basingstoke, v. 25, n. 47, p. 6262-6276, 2006.

BUDOWLE, B.; EISENBERG, A. J.; van DAAL, A. Validity of low copy number typing and applicatins to forensic science. **Croat. Med. J.**, Zagreb, v. 50, n. 3, p. 207-217, 2009.

BURGESS, J. R. Temporal trends for thyroid carcinoma in Australia: an increasing incidence of papillary thyroid carcinoma (1982-1997). **Thyroid**, New York, v. 12, n. 2, p. 141-149, 2002.

BURNINGHAM, A. R. et al. Papillary and follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid: Initial presentation and response to therapy. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 132, n. 6, p. 840-844, 2005.

BYAR, D. P. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 15, n. 8, p. 1033-1041, 1979.

CADY, B. Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, Philadelphia, v. 7, n. 4, p. 633-644, 1998.

CALANGIU, C. et al.

The assessment of prognostic histopathological parameters depending on histological patterns of papillary thyroid carcinoma. **Curr. Health Sci. J.**, Craiova, v. 40, n. 1, p. 37-41, 2014.

CAMPOS, R. O. **Avaliação do status nutricional de iodo em escolas públicas de quatro microrregiões da Bahia**. 88 p. il. 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde (Universidade Federal da Bahia), 2014.

CAMPOS, R. O. et al. Iodine nutritional status in Brazil: a meta-analysis of all studies performed in the country pinpoints to an insufficient evaluation and heterogeneity. **Arq. Bras. Endocr. Metab.**, São Paulo. No prelo 2014.

CANNON-ALBRIGHT, L. A. et al. High quality and quantity Genome-wide germline genotypes from FFPE normal tissue. **BMC Res. Notes**, London, v. 4, p. 159, 2011.

CAPEZZONE, M. et al. Familial non-medullary thyroid carcinoma displays the features of clinical anticipation suggestive of a distinct biological entity. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 15, n. 4, p. 1075-1081, 2008.

CAPPER, D. et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. **Acta. Neuropathol.**, Berlin, v. 122, n. 1, p. 11-19, 2011.

CARLING, T.; OCAL, I. T.; UDELSMAN, R. Special variants of differentiated thyroid cancer: does it alter the extent of surgery versus well-differentiated thyroid cancer? **World. J. Surg.**, New York, v. 31, n. 5, p. 916-923, 2007.

CARNEY, J. A. et al. Hyalinizing trabecular tumors of the thyroid gland are almost all benign. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 32, n. 12, p. 1877-1889, 2008.

CARVALHO, C. V. et al. Extração de DNA. In: CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia de Práticas em Biologia Molecular**, 1 ed. São Caetano do Sul: Ed. Yendis, 2010, p. 1-19.

CAVACO, B. M. et al. Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTC): analysis of fPTC/PRN, NMTC1, MNG1 and TCO susceptibility loci and identification of somatic BRAF and RAS mutations. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 15, n. 1, p. 207-215, 2008.

CETTA, F. et al. Genetic alterations in thyroid carcinoma associated with familial adenomatous polyposis: clinical implications and suggestions for early detection. **World J. Surg.**, New York, v. 22, n. 12, p. 1231-1236, 1998.

CHAKRABORTY, A. et al. BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: significant association with node metastases and extra thyroidal invasion. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v. 23, n. 2, p. 83-93, 2012.

CHAN, E. K. et al. A hormonal association between estrogen metabolism and proliferative thyroid disease. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 134, n. 6, p. 893-900, 2006.

CHARKES, N. D. On the prevalence of familial nonmedullary thyroid cancer in multiply affected kindreds. **Thyroid**, New York, v. 16, n. 2, p. 181-186, 2006.

CHEN, A. Y.; JEMAL, A.; WARD, E. M. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. **Cancer**, New York, v. 115, n. 16, p. 3801-3807, 2009.

CHEN, G. G. et al. Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer. **Curr. Cancer Drug Targets**, Hilversum, v. 8, n. 5, p. 367-377, 2008.

CHEN, Z. et al. Map kinases. **Chem. Rev.**, Easton, v. 101, n. 8, p. 2449-2476, 2001.

CHÉREAU, N. et al. Does extracapsular extension impact the prognosis of papillary thyroid microcarcinoma? **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 21, n. 5, p. 1659-1664, 2014.

CHEUNG, C. C. et al. Hyalinizing trabecular tumor of the thyroid: a variant of papillary carcinoma proved by molecular genetics. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 24, n. 12, p. 1622-1626, 2000.

CHO, J. S. et al. Age and prognosis of papillary thyroid carcinoma: retrospective stratification into three groups. **J. Korean Surg. Soc.**, Seoul, v. 83, n. 5, p. 259-266, 2012.

- CHO, M. A. et al. Expression and role of estrogen receptor alpha and beta in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 195, n. 2, p. 255-263, 2007.
- CHOI, S. Y. et al. The relationship between the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid microcarcinoma and clinicopathologic factors. **World J. Surg. Oncol.**, London, v. 11, p. 291, 2013.
- CHONG, H.; VIKIS, H. G.; GUAN, K. L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cell Signal.**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 463-469, 2003.
- CIAMPI, R.; NIKIFOROV, Y. E. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 163-172, 2005.
- CIAMPI, R.; ZHU, Z.; NIKIFOROV, Y. E. BRAF copy number gains in thyroid tumors detected by fluorescence in situ hybridization. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v. 16, n. 2, p. 99-105, 2005.
- CIBAS, E. S.; ALI, S. Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. **Thyroid**, New York, v. 19, n. 11, p. 1159-1165, 2009.
- CLAIN, J. B. et al. Extrathyroidal extension predicts extranodal extension in patients with positive lymph nodes: an important association that may affect clinical management. **Thyroid**, New York, v. 24, n. 6, p. 951-957, 2014.
- CLARK, J. R. et al. Variables predicting distant metastases in thyroid cancer. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 115, n. 4, p. 661-667, 2005.
- COELI, C. M. et al. Incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 503-509, 2005.
- COHEN, Y. et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 95, n. 8, p. 625-627, 2003.
- CONZO, G. et al. Predictive value of nodal metastases on local recurrence in the management of differentiated thyroid cancer. Retrospective clinical study. **BMC Surg.** London, v. 13, Suppl. 2, S3, 2013.

COOPER, D. S. et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid**, New York, v. 19, n. 11, p. 1167-1214, 2009.

CRAVER, L. F. Cancer of the thyroid and its present-day treatment – embodying the experience of the memorial Hospital of New York. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 82, n. 6, p. 833-853, 1925.

CRILE, G. Jr.; HAZARD, J. B. Relationship of the age of the patient to the natural history and prognosis of carcinoma of the thyroid. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 138, n. 1, p. 33-38, 1953.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

DAILEY, M. E.; LINSAY, S.; SKAHEN, R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. **AMA Arch. Surg.**, Chicago, v. 70, n. 2, p. 291, 1955.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, Basingstoke, v. 417, n. 6892, p. 949-954, 2002.

DAVIES, L.; WELCH, H. G. Current thyroid cancer trends in the United States. **JAMA Otolaryngol. Head Neck. Surg.**, Chicago, v. 140, n. 4, p. 317-322, 2014.

DAVIS, A. H. et al. Direct sequencing is more accurate and feasible in detecting single nucleotide polymorphisms than RFLP: using human vascular endothelial growth factor gene as a model. **Biol. Res. Nurs.**, Thousand Oaks, v. 9, n. 2, p. 170-178, 2007.

DEL RIO, P. et al. The association between papillary carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis: does it modify the prognosis of cancer? **Minerva Endocrinol.**, Torino, v. 33, n. 1, p. 1-5, 2008.

DELELLIS, R. A. et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Endocrine Organs. **IARC Press**, Lyon, 2004.

DEMIDCHIK, Y. E. et al. Comprehensive clinical assessment of 740 cases of surgically treated thyroid cancer in children of Belarus. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 243, n. 4, p. 525-32, 2006.

DHILLON, A. S. et al. Map kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, 2007.

DI CRISTOFARO, J. et al. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 13, n. 2, p. 485-495, 2006.

DONNELLAN, K. A; BIGLER, S. A.; WEIN, R. O. Papillary thyroid carcinoma and familial adenomatous polyposis of the colon. **Am. J. Otolaryngol.**, Chery Hill, v. 30, n. 1, p. 58-60, 2009.

DOUGLAS, M. P.; ROGERS, S. O. DNA damage caused by common cytological fixatives. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 401, n. 1-2, p. 77-88, 1998.

DURANTE, C. et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibits genes involved in iodine metabolism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 92, n. 7, p. 2840-2843, 2007.

DUTENHEFNER, S. L. **Pesquisa da mutação T1799 do gene BRAF e a presença de metástases linfáticas no carcinoma papilífero de tireoide.** 73 p. il. 2011. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011

DVORKIN, S. et al. Differentiated thyroid cancer is associated with less aggressive disease and better outcome in patients with coexisting Hashimoto's thyroiditis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 98, n. 6, p. 2409-2414, 2013.

EAKER, S. et al. Differences in management of older women influence breast cancer survival: results from a population-based database in Sweden. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 3, n. 3, p. 321-328 (E25), 2006.

ELISEI, R. et al. Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 95, n. 4, p. 1516-1527, 2010.

\_\_\_\_\_. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 93, n. 10, p. 3943-3949, 2008.

\_\_\_\_\_. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 86, n. 7, p. 3211-3216, 2001.

ENEWOLD, L. et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 784-791, 2009.

ESPINA, V. et al. Laser-capture microdissection. **Nat. Protoc.**, London, v. 1, n. 2, p. 586-603, 2006.

EUSTATIA-RUTTEN, C. F. et al. Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 91, n. 1, p. 313-319, 2006.

EYCHÈNNE, A. et al. Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. **Oncogene**, Basingstoke, v. 10, n. 6, p. 1159-1165, 1995.

FAGGIANO, A. et al. Age-dependent variation of follicular size and expression of iodine transporters in human thyroid tissue. **J. Nucl. Med.**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 232-237, 2004.

FALVO, L. et al. Prognostic importance of histologic vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 241, n. 4, p. 640-646, 2005.

\_\_\_\_\_. Prognostic importance of sclerosing variant in papillary thyroid carcinoma. **Am. Surg.**, Atlanta, v. 72, n. 5, p. 438-444, 2006.

FAQUIN, W. C. The thyroid gland: recurring problems in histologic and cytologic evaluation. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 132, n. 4, p. 622-632, 2008.

FELDT-RASMUSSEN, U. Iodine and cancer. **Thyroid**, New York, v. 11, n. 5, p. 483-486, 2001.

FENG, L. et al. Utility of BRAF protein overexpression in predicting the metastasis potential of papillary thyroid carcinoma. **Oncol. Lett.**, Athens, v. 2, n. 1, p. 59-63, 2010.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 1374-1403, 2013.

\_\_\_\_\_. Cancer Incidence in Five Continents, Volumes I to IX: IARC Cancerbase No. 9 [Internet]. In: **Internacional Agency for Research on Cancer, 2010**. Disponível em: <<http://ci5.iarc.fr>>. Acesso em 20 mar. 2014.

FERNANDEZ, I. J. Clinical significance of BRAF mutation in thyroid papillary cancer. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 148, n. 6, p. 919-925, 2013.

FINKELSTEIN, A. Papillary thyroid carcinomas with and without BRAF V600E mutations are morphologically distinct. **Histopathology**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 1052-1059, 2012.

FLANAGAN, D. et al. What should we do? Papillary thyroid carcinoma in a lymph node but normal thyroid tissue: how should we proceed? **Eur. J. Surg. Oncol.**, London, v. 26, n. 2, p. 177-180, 2000.

FORBES, S. A. et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. **Nucleic Acids Res.**, London, p. D945-950, 2011.

FORTNER, J. G.; GEORGE, P. A.; STERNBERG, S. S. Induced and spontaneous thyroid cancer in the Syrian (golden) hamster. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 6, p. 364-376, 1960.

FOSS, R. D. et al. Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls. **Diagn. Mol. Pathol.**, New York, v. 3, n. 3, p. 148-155, 1994.

FRANCESCHI, S. Iodine intake and thyroid carcinoma – a potential risk factor. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, Heidelberg, v. 106, Suppl 3, p. S38-S44, 1998.

FRASCA, F. et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 15, n. 1, p. 191-205, 2008.

FRICH, L.; GLATTRE, E.; AKSLEN, L. A. Familial occurrence of nonmedullary thyroid cancer: a population-based study of 5673 first-degree relatives of thyroid cancer patients from Norway. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 10, n. 2, p. 113-117, 2001.



FUGAZZOLA, L. et al. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 239-243, 2004.

\_\_\_\_\_. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 13, n. 2, p. 455-464, 2006.

FUKUI, M. et al. Detection of a raf-related and two other transforming DNA sequences in human tumors maintained in nude mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 82, n. 17, p. 5954-5958, 1985.

FUKUSHIMA, T. et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 41, p. 6455-6457, 2003.

FURUKAWA, K. et al. Long-term trend of thyroid cancer risk among Japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure. **Int. J. Cancer**, New York, v. 132, n. 5, p. 1222-1226, 2013.

FUZIWARA, C. S.; KIMURA, E. T. High iodine blocks a Notch/miR-19 loop activated by the BRAF(V600E) oncoprotein and restores the response to TGF $\beta$  in thyroid follicular cells. **Thyroid**, New York, v. 24, n. 3, p. 453-462, 2014.

GARDNER, R. E. et al. Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Chicago, v. 126, n. 3, p. 309-312, 2000.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 313-319, 2004.

GHOSSEIN, R. et al. Prognostic factors in papillary microcarcinoma with emphasis on histologic subtyping: a clinicopathologic study of 148 cases. **Thyroid**, New York, v. 24, n. 2, p. 245-253, 2014.

GHOSSEIN, R.; LIVOLSI, V. A. Papillary thyroid carcinoma tall cell variant. **Thyroid**, New York, v. 18, n. 11, p. 1179-1181, 2008.

GIANINNI, R. et al. The heterogeneous distribution of BRAF mutation supports the independent clonal origin of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 92, n. 9, p. 3511-3516, 2007.

GIMM, O. Thyroid cancer. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 163, n. 2, p. 143-156, 2001.

GIVENS, D. J. et al. BRAF V600E does not predict aggressive features of pediatric papillary thyroid carcinoma. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 124, n. 9, p. E389-393, 2014.

GOMES, E. M. et al. Frequency of thyroid carcinoma and thyroid autoimmunity in first-degree relatives of patients with papillary thyroid carcinoma: a single center experience. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 55, n. 5, p. 326-330, 2011.

GONTIJO, A. P. M. **Análise molecular da mutação V600E do gene BRAF em microcarcinoma papilar de tireoide**. 58 p. il. 2012. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2012.

GONZALEZ-GONZALEZ, R. et al. Papillary thyroid carcinoma: differential diagnosis and prognostic values of its different variants: review of the literature. **ISRN Oncol.**, Cairo, 2011.

GOUTAS, N. et al. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. **Anticancer Res. Athens**, v. 28, n. 1A, p. 305-308, 2008.

GOUVEIA, C. et al. Lack of association of BRAF mutation with negative prognostic indicators in papillary thyroid carcinoma: the University of California, San Francisco, experience. **JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Chicago, v. 139, n. 11, p. 1164-1170, 2013.

GRECO, A. et al. Molecular pathology of differentiated thyroid cancer. **Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, Torino, v. 53, n. 5, p. 440-453, 2009.

GRIFFITH, O. L. et al. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 24, n. 31, p. 5043-5051, 2006.

GU, L. Q. et al. BRAFV600E mutation and X-linked inhibitor of apoptosis expression in papillary thyroid carcinoma. **Thyroid**, New York, v. 19, n. 4, p. 347-354, 2009.

GUAN, H. et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 94, n. 5, p. 1612-1617, 2009.

GUARINO, V. et al. Thyroid cancer and inflammation. **Mol. Cell Endocrinol.**, Amsterdam, v. 321, n. 1, p. 94-102, 2010.

GUERRA, A. et al. A high percentage of BRAFV600E alleles in papillary thyroid carcinoma predicts a poorer outcome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 97, n. 7, p. 2333-2340, 2012.

\_\_\_\_\_. Concomitant BRAF(V600E) mutation and RET/PTC rearrangement is a frequent occurrence in papillary thyroid carcinoma. **Thyroid**, New York, v. 24, n. 2, p. 254-259, 2014.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 220, n. 2, p. T1-T23, 2014.

HALAIT, H. et al. Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the BRAF gene, used as the companion diagnostic test for the novel BRAF inhibitor vemurafenib in metastatic melanoma. **Diagn. Mol. Pathol.**, New York, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAMZANY, Y. et al. Early death from papillary thyroid carcinoma. **Am. J. Otolaryngol.**, Cherry Hill, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HAQ, M.; HARMER, C. Differentiated thyroid carcinoma with distant metastases at presentation: prognostic factors and outcome. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 87-93, 2005.

HARACH, H. R.; WILLIAMS, G. T.; WILLIAMS, E. D. Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm. **Histopathology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 549-561, 1994.

HAY, I. D. et al. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. **Surgery**, St. Louis, v. 102, n. 6, p. 1088-1095, 1987.

\_\_\_\_\_. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. **Surgery**, St. Louis, v. 114, n. 6, p. 1050-1057, 1993.

HAYASHIDA, N. et al. A rapid and simple detection method for the BRAF(T1796A) mutation in fine-needle aspirated thyroid carcinoma cells. **Thyroid**, New York, v. 14, n. 11, p. 910-915, 2004.

HAYAT, M. J. et al. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. **Oncologist**, v. 12, n. 1, p. 20-37, 2007.

HE, G. et al. Prognostic value of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. **Oncol. Lett.**, Athens, v. 7, n. 2, p. 439-443, 2014.

HENDERSON, Y. C. et al. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. **Clin. Cancer. Res.**, Denville, v. 15, n. 2, p. 485-491, 2009.

HENKE, L. E. et al. BRAF V600E mutational status in pediatric thyroid cancer. **Pediatr. Blood Cancer**, Hoboken, v. 61, n. 7, p. 1168-1172, 2014.

HILLIER, L. W. et al. The DNA sequence of human chromosome 7. **Nature.**, London, v. 424, n. 6945, p. 157-164, 2003.

HIROMATSU, Y.; SATOH, H.; AMINO, N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook. **Hormones (Athens)**, Athens, v. 12, n. 1, p. 12-18, 2013.

HOWELL, G. M. et al. Both BRAF V600E mutation and older age ( $\geq 65$  years) are associated with recurrent papillary thyroid cancer. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 18, n. 13, p. 3566-3571, 2011.

HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011**. National Cancer Institute. Disponível em: <[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/)>. Acesso em: 12 ago. 2014.

HSIEH, S. H. et al. Gender-specific variation in the prognosis of papillary thyroid cancer TNM stages II to IV. **Int. J. Endocrinol.**, Cairo, 2012.

HUANG, Q. et al. Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 28, n. 4, p. 395-403, 2000.

HUGHES, D. T. et al. The most commonly occurring papillary thyroid cancer in the United States is now a microcarcinoma in a patient older than 45 years. **Thyroid**, New York, v. 21, n. 3, p. 231-236, 2011.

HWANG, E. et al. Bilateral papillary thyroid cancer and associated histopathologic findings. **J. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.**, Hamilton, v. 39, n. 3, p. 284-287, 2010.

IKAWA, S. et al. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 8, n. 6, p. 2651-2654, 1988.

ILIE, M. I. et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma: comparative analysis with three DNA-based assays. **Thyroid**, New York, v. 24, n. 5, p. 858-866, 2014.

IMAIZUMI, M. et al. Radiation dose-response relationships for thyroid nodules and autoimmune thyroid diseases in Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors 55-58 years after radiation exposure. **JAMA**, Chicago, v. 295, n. 9, p. 1011-1022, 2006.

ITO, Y. et al. Biological behavior and prognosis of familial papillary thyroid carcinoma. **Surgery**, St. Louis, v. 145, n. 1, p. 100-105, 2009b.

\_\_\_\_\_. 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.**, Tokyo, v. 56, n. 1, p. 89-97, 2009.

\_\_\_\_\_. Prevalence and biological behaviour of variants of papillary thyroid carcinoma: experience at a single institute. **Pathology**, Surry Hills, v. 40, n. 6, p. 617-22, 2008b.

\_\_\_\_\_. Prevalence and prognosis of familial follicular thyroid carcinoma. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 55, n. 5, p. 847-852, 2008.

\_\_\_\_\_. Prevalence and prognostic significance of poor differentiation and tall cell variant in papillary thyroid carcinoma in Japan. **World J. Surg.**, New York, v. 32, n. 7, p. 1535-1543, 2008b.

\_\_\_\_\_. Prognosis and prognostic factors of differentiated thyroid carcinoma after the appearance of metastasis refractory to radioactive iodine therapy. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 61, n. 8, p. 821-824, 2014.

\_\_\_\_\_. Prognosis and prognostic factors of papillary thyroid carcinoma in patients under 20 years. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 59, n. 7, p. 539-545, 2012.

\_\_\_\_\_. Prognostic factors of papillary thyroid carcinoma vary according to sex and patient age. **World. J. Surg.**, New York, v. 35, n. 12, p. 2684-2690, 2011.

\_\_\_\_\_. Prognostic significance of extrathyroid extension of papillary thyroid carcinoma: massive but not minimal extension affects the relapse-free survival. **World. J. Surg.**, New York, v. 30, n. 5, p. 780-786, 2006.

\_\_\_\_\_. Risk factors contributing to a poor prognosis of papillary thyroid carcinoma: validity of UICC/AJCC TNM classification and stage grouping. **World J. Surg.**, New York, v. 31, n. 4, p. 838-848, 2007.

JALISI, S.; AINSWORTH, T.; LAVALLEY, M. Prognostic outcomes of tall cell variant papillary thyroid cancer: a meta-analysis. **J. Thyroid Res.**, New York, 2010.

JANSEN, H. W. et al. Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. **EMBO J.**, Eynsham, v. 2, n. 11, p. 1969-1975, 1983.

\_\_\_\_\_. Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. **Nature**, London, v. 307, n. 5948, p. 281-284, 1984.

JARZAB, B.; HANDKIEWICZ-JUNAK, D.; WLOCH, J. Juvenile differentiated thyroid carcinoma and the role of radioiodine in its treatment: a qualitative review. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 12, n. 4, p. 773-803, 2005.

JEONG, D. et al. BRAF (V600E) mutation analysis in papillary thyroid carcinomas by peptide nucleic acid clamp real-time PCR. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 20, n. 3, p. 759-766, 2013.

JERECZEK-FOSSA, B. A. et al. Radiotherapy-induced thyroid disorders. **Cancer Treat. Rev.**, London, v. 30, n. 4, p. 369-384, 2004.

JING, F. J. et al. BRAF(V600E) mutation is not a positive predictor for distant metastasis in sporadic papillary thyroid carcinoma. **Chin. Med. J. (Engl)**, Peking, v. 126, n. 16, p. 3013-3018, 2013.

JONG, S. A. et al. Thyroid carcinoma and hyperparathyroidism after radiation therapy for adolescent acne vulgaris. **Surgery**, St. Louis, v. 110, n. 4, p. 691-695, 1991.

JONKLAAS, J. et al. The impact of age and gender on papillary thyroid cancer survival. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 97, n. 6, p. E878-887, 2012.

JOO, J. Y. et al. Prediction of occult central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma by preoperative BRAF analysis using fine-needle aspiration biopsy: a prospective study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 97, n. 11, p. 3996-4003, 2012.

JUNG, K. W. et al. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival and prevalence in 2010. **Cancer Res. Treat.**, Seoul, v. 45, n. 1, p. 1-14, 2013.

KANG, S. H. et al. Detection of BRAF V600E mutation with thyroid tissue using pyrosequencing: comparison with PNA-clamping and real-time PCR. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 139, n. 6, p. 759-764, 2013.

KARATZAS, T. et al. Bilateral versus unilateral papillary thyroid microcarcinoma: predictive factors and associated histopathological findings following total thyroidectomy. **Hormones (Athens)**, Athens, v. 12, n. 4, p. 529-536, 2013.

KATOH, R. et al. Multiple thyroid involvement (intraglandular metastasis) in papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 105 consecutive patients. **Cancer**, New York, v. 70, n. 6, p. 1585-1590, 1992.

KAZAURE, H. S.; ROMAN, S. A.; SOSA, J. A. Aggressive variants of papillary thyroid cancer: incidence, characteristics and predictors of survival among 43,738 patients. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 19, n. 6, p. 1874-1880, 2012.

KEBEBEW, E. et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 246, n. 3, p. 466-470, 2007.

KENT, W. D. et al. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. **CMAJ**, Ottawa, v. 177, n. 11, p. 1357-1361, 2007.

KHANAFSHAR, E.; LLOYD, R. V. The spectrum of papillary thyroid carcinoma variants. **Adv. Anat. Pathol.**, New York, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2011.

KILFOY, B. A. et al. International patterns and trends of thyroid cancer incidence, 1973-2002. **Cancer Causes Control**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 525-531, 2009.

KIM, B. Y. et al. Impact of clinicopathologic factors on subclinical central lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma. **Yonsei Med. J.**, Seoul, v. 53, n. 5, p. 924-930, 2012.

KIM, H. J. et al. Multifocality, but not bilaterality, is a predictor of disease recurrence/persistence of papillary thyroid carcinoma. **World. J. Surg.**, New York, v. 37, n. 2, p. 376-384, 2013.

KIM, K. H. et al. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis. **Pathol. Int.**, Carlton South, v. 55, m. 9, p. 540-545, 2005.

\_\_\_\_\_. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. **Yonsei Med. J.**, Seoul, v. 45, n. 5, p. 818-821, 2004.

KIM, M. I.; ALEXANDER, E. K. Diagnostic use of molecular markers in the evaluation of thyroid nodules. **Endocr. Pract.**, Jacksonville, v. 18, n. 5, p. 796-802, 2012.

KIM, S. J. et al. BRAF V600E mutation is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer. **World J. Surg.**, New York, v. 36, n. 2, p. 310-317, 2012.

\_\_\_\_\_. Combined effect of Hashimoto's thyroiditis and BRAF V600E mutation status on aggressiveness in papillary thyroid cancer. **Head Neck**, New York, 2014b.

\_\_\_\_\_. Risk factors for recurrence after therapeutic lateral neck dissection for primary papillary thyroid cancer. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 21, n. 6, p. 1884-1890, 2014.

KIM, S. K. et al. Clinical and pathological features and the BRAF(V600E) mutation in patients with papillary thyroid carcinoma with and without concurrent Hashimoto thyroiditis. **Thyroid**, New York, v. 19, n. 2, p. 137-141, 2009.



\_\_\_\_\_. Surgical results of thyroid nodules according to a management guideline based on the BRAF(V600E) mutation status. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 96, n. 3, p. 658-664, 2011.

KIM, T. Y. et al. Prognostic parameters for recurrence of papillary thyroid microcarcinoma. **BMC Cancer**, London, v. 8, p. 286, 2008.

\_\_\_\_\_. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 588-593, 2005.

\_\_\_\_\_. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 364-368, 2006.

KIM, W. Y. et al. Clinicopathological, immunohistochemical factors and recurrence associated with extrathyroidal extension in papillary thyroid microcarcinoma. **J. Cancer. Res. Ther.**, Mumbai, v. 10, n. 1, p. 50-55, 2014.

KIM, Y. S. et al. Clinical implication of the BRAFV600E mutation in papillary thyroid carcinoma. **World J. Surg. Oncol**, London, v. 11, 2013.

KIMURA, E. T. et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Res.**, Chicago, v. 63, n. 7, p. 1454-1457, 2003.

KIMURA, E. T. Oncogênese molecular das neoplasias da tireoide. In: VOLPI, E.; FRIGUGLIETTI, C.; KULCSAR, M. A. **Câncer de tireoide: abordagem multidisciplinar**. Itapevi: Ed. Ac. Farmacêutica, 2010. p. 20-24.

KLEIMAN, D. A. et al. Thyroid stimulating hormone increases iodine uptake by thyroid cancer cells during BRAF silencing. **J. Surg. Res.**, Philadelphia, v. 182, n. 1, p. 85-93, 2013.

KNAUF, J. A. et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. **Cancer Res.**, Chicago, v. 65, n. 10, p. 4238-4245, 2005.

\_\_\_\_\_. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGF $\beta$  signaling. **Oncogene**, Basingstoke, v. 30, n. 28, p. 3153-3162, 2011.

- KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 5, p. 701-712, 2007.
- KONTUREK, A. et al. Prognostic factors in differentiated thyroid cancer – a 20-year surgical outcome study. **Langenbecks**, Berlin, v. 397, n. 5, p. 809-815, 2012.
- KOO, B. S. et al. Predictive factors for ipsilateral or contralateral central lymph node metastasis in unilateral papillary thyroid carcinoma. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 249, n. 5, p. 840-844, 2009.
- KOPEREK, O. et al. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E-mutated protein in papillary thyroid carcinoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 36, n. 6, p. 844-850, 2012.
- KUHN, E. et al. Different clonal origin of bilateral papillary thyroid carcinoma, with a review of the literature. **Endocr. Pathol.**, Chicago, v. 23, n. 2, p. 101-107, 2012.
- KUMAGAI, A. et al.
- KUO, S. F. et al. Prognosis of multifocal papillary thyroid carcinoma. **Int. J. Endocrinol.**, Cairo, 2013.
- KURTULMUS, N. et al. BRAF(V600E) mutation in Turkish patients with papillary thyroid cancer: strong correlation with indicators of tumor aggressiveness. **Endocrine**, Houndsmills, v. 42, n. 2, p. 404-410, 2012.
- LANDA, I. et al. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 98, n. 9, E1562-1566, 2013.
- LANG, B. H. et al. Classical and follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study on clinicopathologic features and long-term outcome. **World. J. Surg.**, New York, v. 30, n. 5, p. 752-758, 2006.
- LEE, J. H.; LEE, E. S.; KIM, Y. S. Clinicopathologic significance of BRAFV600E mutation in papillary thyroid carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. **Cancer**, New York, v. 110, n. 1, p. 38-46, 2007.

LEE, J. I. et al. BRAFV600E mutation in fine-needle aspiration aspirates: Association with poorer prognostic factors in larger papillary thyroid carcinomas. **Head Neck**, New York, v. 35, n. 4, p. 548-553, 2013.

LEE, J. U. et al. Dual specificity phosphatase 6 as a predictor of invasiveness in papillary thyroid cancer. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 167, n. 1, p. 93-101, 2012.

LEE, K. C. Is BRAF mutation associated with lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer? **Surgery**, St. Louis, v. 152, n. 6, p. 977-983, 2012.

LEE, S. Papillary thyroid carcinoma associated with familial adenomatous polyposis: molecular analysis of pathogenesis in a family and review of the literature. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 51, n. 3, p. 317-323, 2004.

LEE, X. et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in high aggressive papillary thyroid microcarcinoma. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 190, n. 2, p. 168-173, 2009.

LEE, Y. M. et al. Familial history of non-medullary thyroid cancer is an independent prognostic factor for tumor recurrence in younger patients with conventional papillary thyroid carcinoma. **J. Surg. Oncol.**, New York, v. 190, n. 2, p. 168-173, 2014.

LEHMANN, U.; KREIPE, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. **Methods**, Duluth, v. 25, n. 4, p. 409-418, 2001.

LEICHT, D. T. et al. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1773, n. 8, p. 1196-1212, 2007.

LEUNG, A. K; CHOW, S. M.; LAW, S. C. Clinical features and outcome of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 118, n. 1, p. 32-38, 2008.

LI, C. et al. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 97, n. 12, p. 4559-4570, 2012.

LI, N. et al. Impact of enhanced detection on the increase in thyroid cancer incidence in the United States: review of incidence trends by socioeconomic status within the Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry, 1980–2008. **Thyroid**, New York, v. 23, n. 1, p. 103-110, 2013.

LIANG, K. et al. Risk factors of central lymph node metastasis in cN0 papillary thyroid carcinoma: a study of 529 patients. **Med. Sci. Monit.**, Warsaw, v. 20, p. 807-811, 2014.

LIU, D. et al. BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 92, n. 6, p. 2264-2271, 2007.

Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 89, n. 9, p. 4280-4284, 2004.

\_\_\_\_\_. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 13, n. 4, p. 1341-1349, 2007.

LIU, R. T. et al. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 461-466, 2005.

LIU, X. et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 20, n. 4, p. 603-610, 2013.

\_\_\_\_\_. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 99, n. 6, p. E1130-E1136, 2014.

\_\_\_\_\_. The association between BRAF V600E mutation and pathological features in PTC. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, Heidelberg, 2014.

LLOYD, R. V.; BUEHLER, D.; KHANAFSHAR, E. Papillary thyroid carcinoma variants. **Head Neck Pathol.**, Secaucus, v. 5, n. 1, p. 51-56, 2011.

LUDYGA, N. et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 460, n. 2, p. 131-140, 2012.

LUPI, C. et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 92, n. 11, p. 4085-4090, 2007.

MACHENS, A.; HOLZHAUSEN, H. J.; DRALLE, H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. **Cancer**, New York, v. 103, n. 11, p. 2269-2273, 2005.

MACIEJEWSKA, A.; JAKUBOWSKA, J.; PAWLOWSKI, R. Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v. 127, n. 2, p. 309-319, 2013.

MACIEL, R. M. B.; KIMURA, E. T.; CERUTTI, J. M. Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 691-700, 2005.

MACK, W. J. et al. Reproductive and hormonal risk factors for thyroid cancer in Los Angeles county females. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 8, n. 11, p. 991-997, 1999.

MAGAREY, M. J.; FREEMAN, J. L. Recurrent well-differentiated thyroid carcinoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 49, n. 7, p. 689, 694, 2013.

MAI, K. T. et al. Differentiated thyroid carcinomas with vascular invasion: a comparative study of follicular, Hürthle cell and papillary thyroid carcinoma. **Pathology**, Surry Hills, v. 34, n. 3, p. 239-244, 2002.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 3, n. 6, p. 459-465, 2003.

MAMOON, N. et al. The use of fine needle aspiration biopsy in the management of thyroid disease. **J. Pak. Med. Assoc.**, Pakistan, v. 47, n. 10, p. 255-258, 1997.

MANNING, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, New York, v. 298, n. 5600, p. 1912-1934, 2002.

MANTINAN, B. et al. Factors influencing the outcome of patients with incidental papillary thyroid microcarcinoma. **J. Thyroid Res.**, New York, 2012.

MARCELLO, M. A. et al. Obesity and thyroid cancer. **Endocr. Relat. Cancer**. Woodlands, v. 21, n. 5, p. T255-271, 2014.

MAROTTA, V. et al. BRAF mutation positive papillary thyroid carcinoma is less advanced when Hashimoto's thyroiditis lymphocytic infiltration is present. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **Oxford**, v. **79**, n. **5**, p. **733-738**, 2013.

MARTIN, G. S. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell*, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 167-174, 2003.

MATHUR, A. et al. Higher rate of BRAF mutation in papillary thyroid cancer over time: a single-institution study. *Cancer*, New York, v. 117, n. 19, p. 4390-4395, 2011.

MAXWELL, E. L.; HALL, F. T.; FREEMAN, J. L. Familial non-medullary thyroid cancer: a matched-case control study. *Laryngoscope*, St. Louis, v. 114, n. 12, p. 2182-2186, 2004.

MAZEH, H. et al. In patients with thyroid cancer of follicular cell origin, a family history of nonmedullary thyroid cancer in one first-degree relative is associated with more aggressive disease. *Thyroid*, New York, v. 22, n. 1, p. 3-8, 2012.

\_\_\_\_\_. Multifocality in well-differentiated thyroid carcinomas calls for total thyroidectomy. *Am. J. Surg.*, New York, v. 201, n. 6, p. 770-775, 2011.

MAZURAT, A. et al. The age factor in survival of a population cohort of well-differentiated thyroid cancer. *Endocr. Connect.*, Bristol, v. 2, n. 3, p. 154-160, 2013.

MAZZAFERRI, E. L. Thyroid cancer in thyroid nodules: finding a needle in the haystack. *Am. J. Med.*, New York, v. 93, n. 4, p. 359-362, 1992.

MAZZAFERRI, E. L.; JHIANG, S. M. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am. J. Med.*, New York, v. 97, n. 5, p. 418-428, 1994.

MELO, M. et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Springfield, v. 99, n. 5, p. E754-765, 2014.

MENEGASSI, J.; BORDIN, V.; OLIVEIRA, S. S. Diagnostic accuracy between fine needle aspiration biopsy (FNA) and pathological examination of the thyroid. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 288-293, 2013.

MERCER, K. E.; PRITCHARD, C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1653, n. 1, p. 25-40, 2003.

MIAN, C. et al. Sodium iodide symporter and pendrin expression in human thyroid tissues. **Thyroid**, New York, v. 11, n. 9, p. 825-830, 2001.

MICCOLI, P. et al. Papillary thyroid cancer: pathological parameters as prognostic factors in different classes of age. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 138, n. 2, p. 200-203, 2008.

MICHELI, A. et al. The advantage of women in cancer survival: an analysis of EURO CARE-4 data. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 1017-1027, 2009.

MICHELS, J. J. et al. Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. 212-219, 2007.

MITSTAKE, N. et al. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. **Cancer Res.**, New York, v. 65, n. 6, p. 2465-2473, 2005.

MIZRACHI, A. Value of ultrasound in detecting central compartment lymph node metastases in differentiated thyroid carcinoma. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, Heidelberg, v. 271, n. 5, p. 1215-1218, 2014.

MOON, H. J. et al. The role of BRAFV600E mutation and ultrasonography for the surgical management of a thyroid nodules suspicious for papillary thyroid carcinoma on cytology. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 16, n. 11, p. 3125-3131, 2009.

MOON, W. J. et al. BRAF mutation analysis and sonography as adjuncts to fine-needle aspiration cytology of papillary thyroid carcinoma: their relationships and roles. **AJR Am. J. Roentgenol.**, Springfield, v. 198, n. 3, p. 668-674, 2012.

MORRIS, L. G. et al. Tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma: a matched-pair analysis of survival. **Thyroid**, New York, v. 20, n. 2, p. 153-158, 2010.

\_\_\_\_\_. The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. **Thyroid**, New York, v. 23, n. 7, p. 885-891, 2013.

MORRISON, D. K. MAP kinase pathways. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, Woodbury, v. 4, n. 11, 2012.

MOTAZEDIAN, M. et al. Differentiated thyroid carcinoma: comparison of histopathologic characteristics, clinical course, and outcome between young children and adolescents. **Med Oncol.**, Northwood, v. 30, n. 2, p. 506, 2013.

MURUSSI, M. et al. Punção aspirativa de tireóide com agulha fina em um hospital geral: estudo de 754 punções. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 576-583, 2001.

MUSHOLT, P. B. et al. Follicular histotypes of oncocyctic thyroid carcinomas do not carry mutations of the BRAF hot-spot. **World J. Surg.**, New York, v. 32, n. 5, p. 722-728, 2008.

MUZZA, M. et al. The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 72, n. 5, p. 702-708, 2010.

NAKAYAMA, H. et al. Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas. **Anticancer Res.**, Athens, v. 27, n. 5B, p. 3645-3649, 2007.

NAM, J. K. et al. Is the BRAF(V600E) mutation useful as a predictor of preoperative risk in papillary thyroid cancer? **Am. J. Surg.**, New York, v. 203, v. 4, p. 436-441, 2012.

NAMBA, H. et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 88, n. 9, p. 4393-4397, 2003.

NIKIFOROV, Y. E. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v. 17, n. 4, p. 307-317, 2006.

\_\_\_\_\_. Thyroid Tumors: Classification, Staging, and General Considerations. In: NIKIFOROV, Y. E.; BIDDINGER, P. W.; THOMPSON, L. D. R. **Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid: A Comprehensive Guide for Practicing Thyroid Pathology**. 2. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012. p. 108-118.

NIKIFOROV, Y. E.; OHORI, N. P. Papillary Carcinoma. In: NIKIFOROV, Y. E.; BIDDINGER, P. W.; THOMPSON, L. D. R. **Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid: A Comprehensive Guide for Practicing Thyroid Pathology**. 2. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2012. p. 183-246.



NIKIFOROV, Y. E. et al. Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 25, n. 12, p. 1478-1484, 2001.

NIKIFOROVA, M. N. et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 88, n. 11, p. 5399-5404, 2003.

\_\_\_\_\_. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 1-6, 2004.

NIKIFOROVA, M. N.; NIKIFOROV, Y. E. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. **Thyroid**, New York, v. 19, n. 12, p. 1351-1361, 2009.

NILAND, E. E. et al. High quality DNA obtained with and automated DNA extraction method with 70+ year old formalin-fixed celloidin-embedded (FFCE) blocks from the Indiana medical history museum. **Am. J. Transl. Res.**, Madison, v. 4, n. 2, p. 198-205, 2012.

NILSSON, M. Iodide handling by the thyroid epithelial cell. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, Heidelberg, v. 109, n. 1, p. 13-17, 2001.

NILUBOL, N.; ZHANG, L.; KEBEBEW, E. Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. **Thyroid**, New York, v. 26, n. 6, p. 695-702, 2013.

NIXON, I. J. et al. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. **Thyroid**, New York, v. 22, n. 9, p. 884-889, 2012.

NOGUCHI, S. et al. Papillary microcarcinoma. **World J. Surg.**, New York, v. 32, n. 5, p. 747-753, 2008.

NOSÉ, V. Familial thyroid cancer: a review. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 24, Suppl. 2, p. S19-S33, 2011.

NOSÉ, V.; VOLANTE, M.; PAPOTTI, M. Hyalinizing trabecular tumor of the thyroid: an update. **Endocr. Pathol.**, Totowa, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2008.

O'NEILL, C. J. et al. BRAF(V600E) mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer. **Surgery**, St. Louis, v. 148, n. 6, p. 1139-1145, 2010.

OLER, G. et al. Seven-year follow-up of a juvenile female with papillary thyroid carcinoma with poor outcome, BRAF mutation and loss of expression of iodine-metabolizing genes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 52, n. 8, p. 1313-1316, 2008.

OLER, G.; CERUTTI, J. M. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. **Cancer**, New York, v. 115, n. 5, p. 972-980, 2009.

OYER, S. L.; SMITH, V. A.; LENTSCH, E. J. Reevaluation of the prognostic significance of age in differentiated thyroid cancer. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 147, n. 2, p. 221-226, 2012.

PACIFICO, F.; LEONARDI, A. Role of NF-kappaB in thyroid cancer. **Mol. Cell Endocrinol.**, Amsterdam, v. 321, n. 1, p. 29-35, 2010.

PACINI, F. et al. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 154, n. 6, p. 787-803, 2006.

PAPAGEORGIOU, M. S. et al. Multifocality of thyroid carcinomas: a "privilege" of papillary tumors or not? **G. Chir.**, Roma, v. 31, n. 1-2, p. 20-3, 2010.

PAPIN, C. et al. Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, n. 38, p. 24939-24947, 1998.

PAPINI, E. et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 87, n. 5, p. 1941-1946, 2002.

PARK, H. S. et al. Notch1 receptor as a marker of lymph node metastases in papillary thyroid cancer. **Cancer Sci.**, Tokyo, v. 103, n. 2, p. 305-309, 2012.

PARK, S. et al. Differentiated thyroid carcinoma of children and adolescents: 27-year experience in the Yonsei University health system. **J. Korean Med. Sci.**, Seoul, v. 28, n. 5, p. 693-699, 2013.

PARK, S. Y. et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma: evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. **Cancer**, New York, v. 107, n. 8, p. 1831-1838, 2006.

PASSLER, C. et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a long-term follow-up. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 138, n. 12, p. 1362-1366, 2003.

PATEL, A. et al. BRAF(V600E) mutation analysis from May-Grünwald Giemsa-stained cytological samples as an adjunct in identification of high-risk papillary thyroid carcinoma. **Endocr. Pathol.**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 195-199, 2011.

\_\_\_\_\_. Differentiated thyroid carcinoma that express sodium-iodide symporter have a lower risk of recurrence for children and adolescents. **Pediatr. Res.**, Basel, v. 52, n. 5, p. 737-744, 2002.

PATEL, K. N. Genetic mutations, molecular markers and future directions in research. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 49, n. 7, p. 711-721, 2013.

PATHAK, K. A. et al. The changing face of thyroid cancer in a population-based cohort. **Cancer Med.**, Malden, v. 2, n. 4, p. 537-44, 2013.

PELLEGRITI, G. et al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. **J. Cancer Epidemiol.**, Cairo, 2013.

PELTTARI, H. et al. BRAF V600E mutation does not predict recurrence after long-term follow-up in TNM stage I or II papillary thyroid carcinoma patients. **APMIS**, Copenhagen, v. 120, n. 5, p. 380-386, 2012.

PENKO, K. et al.  
BRAF mutations are uncommon in papillary thyroid cancer of young patients. **Thyroid**, New York, v. 15, n. 4, p. 320-325, 2005.

PETRETTI, C.; PRIGENT, C. The Protein Kinase Resource: everything you always wanted to know about protein kinases but were afraid to ask. **Biol. Cell**, Chichester, v. 97, n. 2, p. 113-118, 2005.

PIANA, S. et al. Papillary thyroid microcarcinoma with fatal outcome: evidence of tumor progression in lymph node metastases: report of 3 cases, with morphological and molecular analysis. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 44, n. 4, p. 556-565, 2013.

PITOIA, F. Patients with familial non-medullary thyroid cancer have an outcome similar to that of patients with sporadic papillary thyroid tumors. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 3, p. 219-223, 2011.

PLAIL, R. O. et al. Adenomatous polyposis: an association with carcinoma of the thyroid. **Br. J. Surg.**, Bristol, v. 74, n. 5, p. 377-380, 1987.

PRESCOTT, J. D. et al. BRAF V600E status adds incremental value to current risk classification systems in predicting papillary thyroid carcinoma recurrence. **Surgery**, St. Louis, v. 152, n. 6, p. 984-990, 2012.

PUXEDDU, E. et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 89, n. 5, p. 2414-2420, 2004.

PYO, J. S. et al. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B contributes to growth and aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart, v. 209, n. 4, p. 228-232, 2013.

QI, M.; ELION, E. A. MAP kinases pathway. **J. Cell Sci.**, London, v. 118, n. Pt 16, p. 3569-3572, 2005.

QUIROS, R. M. et al. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. **Cancer**, New York, v. 103, n. 11, p. 2261-2268, 2005.

RABELO-GONÇALVES, E. et al. Evaluation of five DNA extraction methods for detection of *H. pylori* in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart, v. 210, n. 3, p. 142-146, 2014.

RADOWSKI, J. S. et al. Impact of degree of extrathyroidal extension of disease on papillary thyroid cancer outcome. **Thyroid**, New York, v. 24, n. 2, p. 241-244, 2014.

RAJORIA, S. et al. Estrogen activity as a preventive and therapeutic target in thyroid cancer. **Biomed. Pharmacother**, New York, v. 66, n. 2, p. 151-158, 2012.

RAPP, U. R. et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 80, n. 14, p. 4218-4222, 1983.

REGO-IRAETA, A. et al. Time trends for thyroid cancer in northwestern Spain: true rise in the incidence of micro and larger forms of papillary thyroid carcinoma. **Thyroid**, New York, v. 19, n. 4, p. 333-340, 2009.

RENUKA, I. V. et al. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: interpretation and guidelines in surgical treatment. **Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Calcutta, v. 64, n. 4, p. 305-311, 2012.

REZZÓNICO, J. N. et al. Increased prevalence of insulin resistance in patients with differentiated thyroid carcinoma. **Metab. Syndr. Relat. Disord.**, Larchmont, v. 7, n. 4, p. 375-380, 2009.

RICARTE-FILHO, J. C. et al. Effects of let-7 microRNA on cell growth and differentiation of papillary thyroid cancer. **Transl. Oncol.**, Ann Arbor, v. 2, n. 4, p. 236-241, 2009.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G. 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> targeting to the membrane. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 13, n. 1, p. 257-269, 2006.

RINGEL, M. D. et al. Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 14, n. 4, p. 289-296, 2001.

RIVERA, M. et al. Histopathologic characterization of radioactive iodine-refractory fluorodeoxyglucose-positron emission tomography-positive thyroid carcinoma. **Cancer**, New York, v. 113, n. 1, p. 48-56, 2008.

RIVKEES, S. A. et al. The treatment of differentiated thyroid cancer in children: emphasis on surgical approach and radioactive iodine therapy. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 32, n. 6, p. 798-826, 2011.

ROBENSHTOK, E. Clinical characteristics and outcome of familial nonmedullary thyroid cancer: a retrospective controlled study. **Thyroid**, New York, v. 21, n. 1, p. 43-48, 2011.

ROMAN, S.; SOSA, J. A. Aggressive variants of papillary thyroid cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 33-38, 2013.

ROMEI, C. et al. Modifications in the papillary thyroid cancer gene profile over the last 15 years. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 97, n. 9, p. E1758-E1765, 2012.

RON, E. et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 141, n. 3, p. 259-277, 1995.

RONGA, G. et al. Lung metastases from differentiated thyroid carcinoma. A 40 years' experience. **Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, Torino, v. 48, n. 1, p. 12-19, 2004.

ROSARIO, P. W. et al. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 4, p. 240-264, 2013.

ROSENBAUM, R. Mutational activation of BRAF is not a major event in sporadic childhood papillary thyroid carcinoma. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 18, n. 7, p. 898, 902, 2005.

ROSKOSKI, R. Jr. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 399, n. 3, p. 313-317, 2010.

ROUTHIER, C. A. et al. Comparison of 2 monoclonal antibodies of immunohistochemical detection of BRAF V600E mutation in malignant melanoma, pulmonary carcinoma, gastrointestinal carcinoma, thyroid carcinoma, and gliomas. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 44, n. 11, p. 2563-2570, 2013.

RUFINI, V. et al. Thyroid carcinomas with a variable insular component: prognostic significance of histopathologic patterns. **Cancer**, New York, v. 110, n. 6, p. 1209-1217, 2007.

RYU, I. S. et al. Lymph node ratio of the central compartment is a significant predictor for locoregional recurrence after prophylactic central neck dissection in patients with thyroid papillary carcinoma. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 277-283, 2014.

SAAD, A. G. et al. Proliferative activity of human thyroid cells in various age groups and its correlation with the risk of thyroid cancer after radiation exposure. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 91, n. 7, p. 2672-2677, 2006.

SAKORAFAS, G. H. et al. Microscopic papillary thyroid cancer as an incidental finding in patients treated surgically for presumably benign thyroid disease. **J. Postgrad. Med.**, Bombay, v. 53, n. 1, p. 23-26, 2007.

SALAJEGHEH, A. et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a diagnostic challenge for clinicians and pathologists. **Postgrad. Med. J.**, London, v. 84, n. 988, p. 78-82, 2008.

SALVATORE, G. 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.**, Springfield, v. 89, n. 10, p. 5175-5180, 2004.

\_\_\_\_\_. BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 12, n. 5, p. 1623-1629, 2006.

\_\_\_\_\_. Molecular profile of hyalinizing trabecular tumours of the thyroid: high prevalence of RET/PTC rearrangements and absence of B-raf and N-ras point mutations. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 816-821, 2005.

SANCISI, V. et al. BRAFV600E mutation does not mean distant metastasis in thyroid papillary carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 97, n. 9, p. E1745-1749, 2012.

SANTIN, A. P; FURLANETTO, T. W. Role of estroge in thyroid function and growth regulation. **J. Thyroid. Res.**, New York, 2011.

SANTORO, M.; MELILLO, R. M.; FUSCO, A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 155, n. 5, p. 645-653, 2006.

SAPIO, M. R. et al. Detection of BRAF mutation in thyroid papillary thyroid carcinomas by mutante allele-specific PCR amplification (MASA). **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 154, n. 2, p. 341-348, 2006.

SASSOLAS, G. et al. Oncogenic alterations in papillary thyroid cancers of young patients. **Thyroid**, New York, v. 22, n. 1, p. 17-26, 2012.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Moll. Cell Biol.**, Washington, v. 19, n. 4, p. 2435-2444, 1999.

SCHALLER, R. T. Jr.; STEVENSON, J. K. Development of carcinoma of the thyroid in iodine-deficient mice. **Cancer**. New York, v. 19, n. 8, p. 1063-1080, 1966.

SCHLUMBERGER, M.; PACINI, F. Prognostic factors. In: **Thyroid tumors**. 3. Ed. Paris: Ed. Nucléon, 2006. p. 111-125.

\_\_\_\_\_. Thyroid nodule. In: **Thyroid tumors**. 3. Ed. Paris: Ed. Nucléon, 2006. p. 11-31.

SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 5, p. 541-548, 2011.

SENGUVEN, B. et al. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. **Int. J. Med. Sci.**, Australia, v. 11, n. 5, p. 494-499, 2014.

SENTHI, N.; KANG, Y. Notch signaling in cancer progression and bone metastasis. **Br. J. Cancer**, London, v. 105, n. 12, p. 1805-1810.

SERTH, J. et al. Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 156, n. 4, p. 1189-1196, 2000.

SHACKELFORD, W. et al. A new technology for mutation detection. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1022, n. 257-262, 2004.

SHATTUCK, T. M. et al. Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 352, n. 23, p. 2406-2412, 2005.

SHAW, A.; SEMENCIW, R.; MERY, L. Cancer in Canada fact sheet series #1 - thyroid cancer in Canada. **Chronic Dis. Inj. Canc.**, Ottawa, v. 34, n. 1, p. 64-68, 2014.

SHEILS, O. M. et al. Ret/PTC-1 activation in hashimoto thyroiditis. **Int. J. Surg. Pathol.**, Naperville, v. 8, n. 3, p. 185-189, 2000.

SHEILS, O. M.; SWEENEY, E. C. TSH receptor status of thyroid neoplasms – Taqman RT-PCR analysis of archival material. **J. Pathol.**, London, v. 188, n. 1, p. 87-92, 1999.



SHEN, W. T. et al. Central neck lymph node dissection for papillary thyroid cancer: a comparison of complication and recurrence rates in 295 initial dissections and reoperations. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 145, n. 3, p. 272-275, 2010.

SHERMAN, S. I. Thyroid carcinoma. **Lancet**, London, v. 361, n. 9356, p. 501-511, 2003.

SHERMAN, S. I. et al. Prospective multicenter study of thyroiscarcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. **Cancer**, New York, v. 83, n. 5, p. 1012-1021, 1998.

SHEU, S. Y. Lack of correlation between BRAF V600E mutational status and the expression profile of a distinct set of miRNAs in papillary thyroid carcinoma. **Horm. Metab. Res.**, Stuttgart, v. 41, n. 6, p. 482-487, 2009.

SILANDER, K.; SAARELA, J. Whole genome amplification with Phi29 DNA polymerase to enable genetic or genomic analysis of samples of low DNA yield. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v. 439, p. 1-18, 2008.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 452-462, 2009.

SILVER, C. E. et al. Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. **Head Neck**, New York, v. 33, n. 7, p. 1052-1059, 2011.

SILVA, R. C. **Análise da mutação V600E do gene BRAF e detecção imuno-histoquímica da proteína BRAF em carcinomas papilíferos de tireoide**. 79 p. il. 2012. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2012.

SIMARD, E. P. et al. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. **CA Cancer J. Clin.**, New York, 2012.

SIMONATO, L. E. et al. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 121-127, 2007.

SIWOSKI, A. et al. An efficient method for the assessment of DNA quality of archival microdissected specimens. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 15, n. 8, p. 889-892, 2002.

SMALLRIGDE, R. C.; MARLOW, L. A.; COPLAND, J. A. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. **Endocr. Relat. Cancer**, Woodlands, v. 16, n. 1, p. 17-44, 2009.

SMITH, R. A. et al. Correlation between BRAF mutation and the clinicopathological parameters in papillary thyroid carcinoma with particular reference to follicular variant. **Human Pathol.**, Philadelphia, v. 42, n. 4, p. 500-506, 2011.

SMYTH, P. et al. RET/PTC and BRAF act as distinct molecular, time-dependent triggers in a sporadic Irish cohort of papillary thyroid carcinoma. **Int. J. Surg. Pathol.**, Naperville, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2005.

SNIEZEK, J. C.; HOLTEL, M. Rare tumors of the thyroid gland. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 107-115, 2003.

SOARES, P. et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in etiopathogenesis of PTC. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 29, p. 4578-4580, 2003.

\_\_\_\_\_. BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 444, n. 6, p. 572-576, 2004.

SORAVIA, C. et al. Familial adenomatous polyposis-associated thyroid cancer: a clinical, pathological, and molecular genetics study. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 154, n. 1, p. 127-135, 1999.

SOTOCA, A. M. Phytoestrogen-mediated inhibition of proliferation of the human T47D breast cancer cells depends on the ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 112, n. 4-5, p. 171-178, 2008.

STANOJEVIC, B. et al. Mutational and clinico-pathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbia. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 58, n. 5, p. 381-393, 2011.

STORM, S. M.; CLEVELAND, J. L., RAPP, U. R. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. **Oncogene**, Basingstoke, v. 5, n. 3, p. 345-351, 1990.

SUTRAVE, P. et al. Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil: homologue of murine retroviral oncogene v-raf. **Nature**, London, v. 309, n. 5963, p. 85-88, 1984.

SYKOROVA, V. et al. BRAFV600E mutation in the pathogenesis of a large series of papillary thyroid carcinoma in Czech Republic. **J. Endocrinol. Invest.**, Milano, v. 33, n. 5, p. 318-324, 2010.

SYWAK, M.; PASIEKA, J. L.; OGILVIE, T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation. **J. Surg. Oncol.**, New York, v. 86, n. 1, p. 44-54, 2004.

TAKAHASHI, T. et al. The relationship of thyroid cancer with radiation exposure from nuclear weapon testing in the Marshall Islands. **J. Epidemiol.**, Tokyo, v. 13, n. 2, p. 99-107, 2003.

TAKANO, T. et al. BRAF V600E mutation in anaplastic thyroid carcinomas and their accompanying differentiated carcinomas. **Br. J. Cancer**, London, v. 96, n. 10, p. 1549-1553, 2007.

TOKUDA, Y. et al. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 43, n. 9, p. 748-751, 1990.

TOMER, Y.; MENCONI, F. Interferon induced thyroiditis. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, Amsterdam, v. 23, n. 6, p. 703-712, 2009.

TRIMBOLI, P. et al. Trend in thyroid carcinoma size, age at diagnosis, and histology in a retrospective study of 500 cases diagnosed over 20 years. **Thyroid**, New York, v. 16, n. 11, p. 1151-1155, 2006.

TRIPONEZ, F. et al. Does familial non-medullary thyroid cancer adversely affect survival? **World J. Surg.**, New York, v. 30, n. 5, p. 787-793, 2006.

TROVISCO, V. et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. **J. Pathol.**, London, v. 202, n. 2, p. 247-251, 2004.

\_\_\_\_\_. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 446, n. 6, p. 589-595, 2005.

TUFANO, R. P.; BISHOP, J.; WU, G. Reoperative central compartment dissection for patients with recurrent/persistent papillary thyroid cancer: efficacy, safety, and the association of the BRAF mutation. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 122, n. 7, p. 1634-1640, 2012.

TUTTLE, R. M.; LEBOEUF, R. Follow up approaches in thyroid cancer: a risk adapted paradigm. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 419-435, 2008.

UCHINO, S. et al. Mutational analysis of the APC gene in cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma. **World J. Surg.**, New York, v. 30, n. 5, p. 775-779, 2006.

UDELL, C. M. et al. Mechanistic principles of RAF kinase signaling. **Cell Mol. Life Sci.**, Basel, v. 68, n. 4, p. 553-565, 2011.

UGOLINI, C. et al. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. **Thyroid**, New York, v. 17, n. 5, p. 381-388, 2007.

ULISSE, S. et al. In papillary thyroid carcinoma BRAFV600E is associated with the increased expression of the urokinase plasminogen activator and its cognate receptor, but not with disease-free interval. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 77, n. 5, p. 780-786, 2012.

VAISMAN, F.; CORBO, R.; VAISMAN, M.. Thyroid carcinoma in children and adolescents – systematic review of the literature. **J. Thyroid Res.**, New York, 2011.

VEIGA, L. H. et al. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER program, 1997-2008. **Thyroid**, New York, v. 23, n. 6, p. 748-757, 2013.

VERBURG, F. A. et al. Histology does not influence prognosis in differentiated thyroid carcinoma when accounting for age, tumour diameter, invasive growth and metastases. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 160, n. 4, p. 619-624, 2009.

\_\_\_\_\_. Life expectancy is reduced in differentiated thyroid cancer patients  $\geq 45$  years old with extensive local tumor invasion, lateral lymph node, or distant metastases at diagnosis and normal in all other DTC patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 98, n. 1, p. 172-180, 2013.

VERGAMINI, L. B. et al. Increase in the incidence of differentiated thyroid carcinoma in children, adolescents, and young adults: a population-based study. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 164, n. 6, p. 1481-1485, 2014.

VIGNERI, P. et al. Obesity and cancer. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Heidelberg, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2006.

VINAGRE, J. et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. **Nat Commun.**, London, v. 4, p. 2185, 2013.

VIRK, R. K. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a genotype-phenotype correlation. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 26, n. 1, p. 62-70, 2013.

WADA, N. et al. Lymph node metastasis from 259 papillary thyroid microcarcinomas: frequency, pattern of occurrence and recurrence, and optimal strategy for neck dissection. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 237, n. 3, p. 399-407, 2003.

WALCZIK, A. et al. The BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid microcarcinoma: does the mutation have an impact on clinical outcome? **J. Clin. Endocrinol. (Oxf)**, Oxford, v. 80, n. 6, p. 889-904, 2014.

WAN, P. T. et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 6, p. 885-867, 2004.

WANG, J.; WANG, F. W. Impact of age on clinical presentation, treatment, and cancer-specific survival of patients with small-cell carcinoma of prostate. **Clin. Interv. Aging**, Auckland, v. 8, p. 871-877, 2013.

WANG, W. et al. Poorer prognosis and higher prevalence of BRAF (V600E) mutation in synchronous bilateral papillary thyroid carcinoma. **Ann. Surg. Oncol.**, New York, v. 19, n. 1, p. 31-36, 2012.

WARD, L. S. Immune response in thyroid cancer: widening the boundaries. **Scientifica**. Cairo, 2014.

WEBER, F.; ENG, C. Gene-expression profiling in differentiated thyroid cancer – a viable strategy for the practice of genomic medicine? **Future Oncol.**, London, v. 1, n. 4, p. 497-510, 2005.

WELLBROOK, C.; KARASARIDES, M.; MARAIS, R. The RAF proteins take centre stage. **Nat. Rev. Cell Biol.**, London, v. 5, n. 11, p. 875-885, 2004.

WENIG, B. M. et al. Thyroid papillary carcinoma of columnar cell type: a clinicopathologic study of 16 cases. **Cancer**, New York, v. 82, n. 4, p. 740-753, 1998.

WILLIAMS, C. et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 155, n. 5, p. 1467-1471, 1999.

WIRTSCHAFTER, A. et al. Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker for papillary thyroid carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 107, n. 1, p. 95-100, 1997.

WISEMAN, S. M. et al. Identification of molecular markers altered during transformation of differentiated into anaplastic thyroid carcinoma. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 142, n. 8, p. 727-729, 2007.

WOLIN, K. Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G. A. Obesity and cancer. **Oncologist**, Dayton, v. 15, n. 6, p. 556-565, 2010.

WU, H. H.; JONES, J. N.; OSMAN, J. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid: ten years experience in a community a community teaching hospital. **Diagn. Cytopathol.**, New York, v. 34, n. 2, p. 93-96, 2006.

XING, M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 28, n. 7, p. 742-762, 2007.

\_\_\_\_\_. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 13, n. 3, p. 184-199, 2013.

XING, M. et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. **JAMA**, Chicago, v. 309, n. 14, p. 1493-1501, 2013.

\_\_\_\_\_. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 89, n. 3, p. 1365-1368, 2004.

\_\_\_\_\_. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 90, n. 12, p. 6373-6379, 2005.

\_\_\_\_\_. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 27, n. 18, p. 2977-2982, 2009.

\_\_\_\_\_. TERT Promoter mutation cooperates with BRAF mutation to promote thyroid cancer recurrence. *Thyroid*, New York, v. 23, n. Suppl. 1, p. A115-A121, 2013.

XU, B. et al. Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma: a pathological and molecular genetic study with evidence of frequent somatic mutations in exon 3 of the beta-catenin gene. **J. Pathol.**, London, v. 199, n. 1, p. 58-67, 2003.

XU, L. et al. Family history of cancer and risk of sporadic differentiated thyroid carcinoma. **Cancer**, New York, v. 118, n. 5, p. 1228-1235, 2012.

XU, X. et al. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. **Cancer Res**, Chicago, v. 63, n. 15, p. 4561-4567, 2003.

YAMASHITA, A. S. et al. Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation. **Transl. Oncol.**, Ann Arbor, v. 6, n. 2, p. 197-205, 2013.

YANG, L.; SHEN, W.; SAKAMOTO, N. Population-based study evaluating and predicting the probability of death resulting from thyroid cancer and other causes among patients with thyroid cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 31, n. 4, p. 468-474, 2013.

YASSA, L. et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. **Cancer**, New York, v. 111, n. 6, p. 508-516, 2007.

YOO, F. et al. Characteristics of incidentally discovered thyroid cancer. **JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Chicago, v. 139, n. 11, p. 1181-1186, 2013.

ZAGZAG, J. et al. Clinical utility of immunohistochemistry for the detection of the BRAF v600e mutation in papillary thyroid carcinoma. **Surgery**, St. Louis, v. 154, n. 6, p. 1199-1204, 2013.

ZENG, Q. et al. Oestrogen mediated the growth of human thyroid carcinoma cells via and oestrogen receptor-ERK pathway. **Cell Prolif.**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 921-935, 2007.

ZHANG, B. H.; GUAN, K. L. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. **EMBO J.**, Oxford, v. 19, n. 20, p. 5429-5439, 2000.

ZHANG, L. et al. The clinical features of papillary thyroid cancer in Hashimoto's thyroiditis patients from an area with a high prevalence of Hashimoto's disease. **BMC Cancer**, London, v. 12, p. 610, 2012.

ZHAO, Z. G. et al. Overweight, obesity and thyroid cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. **J. Int. Med. Res.**, Northampton, v. 40, n. 6, p. 2041-2050, 2012.

ZHENG, X. et al. BRAFV600E status and clinical characteristics in solitary and multiple papillary thyroid carcinoma: experience of 512 cases at a clinical center in China. **World J. Surg. Oncol.**, London, v. 10, 2012b.

ZHENG, X. Q. et al. Progression of solitary and multifocal papillary thyroid carcinoma – a retrospective study of 368 patients. **Chin. Med. J. (Engl.)**, Peking, v. 125, n. 24, p. 4434-4439, 2012.

ZHOU, Y. L. et al. Factors predictive of papillary thyroid micro-carcinoma with bilateral involvement and central lymph node metastasis: a retrospective study. **World J. Surg. Oncol.**, London, v. 10, p. 67, 2012.

ZHU, C. et al. A birth cohort analysis of the incidence of papillary thyroid cancer in the United States, 1973-2004. **Thyroid**, New York, v. 19, n. 10, p. 1061-1066, 2009.

ZIDAN, J. et al. Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma: clinical features, prognostic factors, treatment, and survival. **Cancer**, New York, v. 97, n. 5, p. 1181-1185, 2003.

ZIMMERMANN, J. et al. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. **Front. Zool.**, London, v. 5, p. 18, 2008.

ZOGLAMI, A. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: predictive value for long-term prognosis and radioiodine sensitivity. **Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.**, Issy les Mounlineaux, v. 131, n. 1, p. 7-13, 2014.

ZUO, H. et al. Lack of association between BRAF V600E mutation and mitogen-activated protein kinase activation in papillary thyroid carcinoma. **Pathol. Int.**, Carlton South, v. 57, n. 1, p. 12-20, 2007.



## APÊNDICE A – ESTADIAMENTO TUMORAL DE CARCINOMAS BEM DIFERENCIADOS DA TIREOIDE BASEADO NA 7ª EDIÇÃO DO SISTEMA TNMA/AJCC

Nomenclatura:						
<b>Regras gerais :</b>						
T: extensão do tumor primário						
N: extensão de metástases em linfonodos regionais (ausência ou presença)						
M: metástases à distância (ausência ou presença)						
Tx: tumor primário não pode ser avaliado						
T0: não há evidência de tumor primário						
T1: tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão, limitado à tireoide						
T1a: ≤ 1 cm						
T1b: > 1 cm, mas ≤ 2 cm						
T2: tumor > 2 cm, mas ≤ 4 cm, em sua maior dimensão, limitado à tireoide						
T3: tumor > 4 cm, limitado à tireoide; qualquer tumor com invasão extratireoidiana mínima (extensão ao músculo esterno-tireoidiano ou partes moles peri-tiroidianas)						
T4: qualquer tumor que se estende além da cápsula tireoidiana						
T4a: tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: tecido subcutâneo mole, laringe, traquéia, esôfago, nervo laríngeo recorrente						
T4b: tumor que invade fáscia pré-vertebral, vasos mediastinais ou adjacente artéria carótida						
Nx: linfonodos regionais não podem ser avaliados						
N0: não há evidência de metástase em linfonodos regionais						
N1: presença de metástase em linfonodos regionais						
N1a: metástase para o nível VI (linfonodos pré-traqueal e para-traqueal, incluindo pré-laríngeo e o de Delphian)						
N1b: metástases linfonodo cervical unilateral, bilateral ou contralateral (níveis I; II; III; IV ou V) ou linfonodo mediastinal superior ou retrofaríngeo (nível VII)						
M0: ausência de metástase à distância						
M1: presença de metástase à distância						
Estadiamento tumoral						
	< 45 anos			≥ 45 anos		
Estádio I	Qualquer T	Qualquer N	M0	T1	N0	M0
Estádio II	Qualquer T	Qualquer N	M1	T2	N0	M0
Estádio III				T3	N0	M0
				T1-3	N1a	M0
Estádio IVA				T4a	N0-1a	M0
				T1-4a	N1b	M0
Estádio IVB				T4b	Qualquer N	M0
Estádio IVC				Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: adaptado de AJCC (2010).

**APÊNDICE B – DESENHOS DE ESTUDO, CASUÍSTICAS E METODOLOGIAS APLICADAS POR DIFERENTES ESTUDOS QUE INVESTIGARAM A ASSOCIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF<sup>V600E</sup> E ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS DO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE**

Referência	Local	N	BRAFV600E (%)	Estudo	Amostras	Dissecção	Método de detecção
ABROSIMOV et al, 2007	Rússia	40	57,5	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SD
AHN et al, 2012	Coreia do Sul	107	79,4	Retrospec.	TP	Manual	PCR
BASOLO et al, 2010	Itália	1060	44,6	Retrospec.	TP	NI	SSCP/SD
BOMMARITO et al, 2011	Itália	56	50	Retrospec.	NI	NA	PCR
CHAKRABORTY et al, 2011	Índia	86	53,4	Retrospec.	TC	NA	PCR/SD
ELISEI et al, 2008	Itália	102	37,3	Prospec.	TP	Manual	SSCP/SD
FERNANDEZ et al, 2013	Itália	297	58,3	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SD
FINKELSTEIN et al, 2012	EUA	56	60,7	Retrospec.	PAAF	NA	PCR/SD
FRASCA et al, 2008	Itália	323	38,6	Retrospec.	TP	Laser	PCR/SD
FUGAZZOLA et al, 2006	Itália	260	38	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SSCP/SD
GOUTAS et al, 2008	Grécia	55	27,2	Retrospec.	TP	NI	RFLP/SD
GU et al, 2009	China	123	34,1	Retrospec.	TP	NI	PCR/SD
GUAN et al, 2009	China	1032	62	Retrospec.	TP	NI	PCR/SD
GUERRA et al, 2012	Itália	168	36,9	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SD/Piroseq.
HOWELL et al, 2011	EUA	219	39,2	Prospec.	PAAF	NA	PCR/FMCA
ITO et al, 2009b	Japão	631	38,4	Prospec.	TP	Manual	PCR/SD
JEONG et al, 2013	Coreia do Sul	211	90	Retrospec.	TP	NI	PCR/SD
JOO et al, 2012	Coreia do Sul	148	53,4	Prospec.	PAAF	NA	PCR/Pirosequenciamento
KANG et al, 2013	Coreia do Sul	100	77	Retrospec.	TP	NI	PCR/Pirosequenciamento
KIM, S. J. et al, 2012	Coreia do Sul	547	69,7	Prospec.	TP	Manual	PCR/SD
KIM, S. K. et al, 2011	Coreia do Sul	169	91,2	Prospec.	PAAF	NA	PCR/Pirosequenciamento
KIM, T. Y. et al, 2006	Coreia do Sul	203	73,4	Prospec.	TP	NI	PCR/SD
KLEIMAN et al, 2013	EUA	47	51	Retrospec.	TC	NA	PCR/SD
KOPEREK et al, 2012	Áustria	144	52,8	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SD
KURTULMUS et al, 2012	Turquia	109	39,4	Retrospec.	TP	NI	PCR/FMCA
LEE et al, 2012	Coreia do Sul	166	70	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SD
LEE et al, 2012b	EUA	63	69,8	Retrospec.	TP	NI	Deteção colorimétrica
LEE et al, 2013	Coreia do Sul	605	67	Prospec.	PAAF	NA	PCR/SD
LIU et al, 2005	Taiwan	105	47	Retrospec.	TC	NA	PCR/SD
LUPI et al, 2007	Itália	500	43,8	Retrospec.	TP	NI	SSCP/SD
MOON, H. J. et al, 2009	Coreia do Sul	84	50	Retrospec.	PAAF	NA	PCR/SD
MOON, W. J. et al, 2012	Coreia do Sul	164	85,9	Retrospec.	PAAF	NA	PCR/Pirosequenciamento
NAKAYAMA et al, 2007	Japão	40	65	Retrospec.	TC	NA	PCR/SD
NAM et al, 2012	Coreia do Sul	424	79	Retrospec.	TC	NA	PCR/SD
OLER; CERUTTI, 2009	Brasil	120	48	Prospec.	NI	NA	RT-PCR/SD
O'NEILL et al, 2010	Austrália	101	59	Prospec.	TP	NI	RFLP/SD
PARK, H. S. et al, 2012	Coreia do Sul	181	84	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SD
PARK, S. Y. et al, 2006	Coreia do Sul	61	52,4	Retrospec.	TP	Manual	RFLP/SD
PATEL, A. et al, 2011	Ucrânia	104	45,2	Retrospec.	PAAF	NA	RFLP/SD
PELTARI et al, 2012	Finlândia	51	66,7	Prospec.	TP	NI	PCR
PYO et al, 2013	Coreia do Sul	122	90,2	Retrospec.	TP	NI	PCR
RIESCO-EIZAGUIRRE et al, 2006	Espanha	67	41,7	Retrospec.	TP	NI	SSCP/SD
SAPIO et al, 2006	Itália	43	40,2	Retrospec.	TP	Manual	PCR/SD
SMITH et al, 2011	Austrália	76	45	Retrospec.	TP	Manual	RFLP/SD
STANOJEVIC et al, 2011	Sérvia	266	31,6	Prospec.	TP	Manual	PCR/SD
SYKOROVA et al, 2010	Rep. Tcheca	242	33,5	Retrospec.	TP	NI	SSCP/SD
ULISSE et al, 2012	Itália	91	48,4	Prospec.	TC	NA	PCR/SD
VIRK et al, 2013	EUA	129	70	Retrospec.	PAAF	NA	PCR
WANG, W. et al, 2012	China	208	55,2	Retrospec.	TP	NI	PCR/SD
XING et al, 2009	EUA	190	38,4	Prospec.	PAAF	NA	Deteção colorimétrica
ZAGZAG et al, 2013	EUA	37	76	Retrospec.	TP	NA	Imunohistoquímica
ZHENG, X. et al, 2012	China	512	51,4	Prospec.	TP	Laser	PCR/SD
ZUO et al, 2007	Japão	42	66,7	Retrospec.	TC	NA	PCR/SD

**Legenda:**  
 FMCA: fluorescence melting curve analysis      RFLP: restriction fragment length polymorphism      TC: tecido congelado  
 NA: Não aplicável      RT-PCR: reverse transcriptase PCR      TP: tecido parafinado  
 NI: Não informado      SD: sequenciamento direto  
 PCR: polymerase chain reaction      SSCP: single-strand conformation polymorphism

Fonte: Elaborado pela autora. Estudos incluídos na meta-análise de Xin Liu e colaboradores (2014).

**APÊNDICE C – RESULTADOS OBTIDOS DE ESTUDOS QUE INVESTIGARAM A ASSOCIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF<sup>V600E</sup> E ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS DO CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE**

Referência	Idade	Sexo	Sub. Hist.	Tamanho	MF	Inv. Vasc.	EET	Meta LN	Meta DT	Est. Clin. (TNM)
ABROSIMOV et al, 2007	+	=	NA	=	+	=	=	=	NA	=
AHN, D. et al, 2012	=	=	NA	=	=	NA	=	=	NA	=
BASOLO et al, 2010	+	=	NA	+	+	NA	+	+	NA	+
BOMMARITO et al, 2011	=	=	+	=	=	NA	NA	=	=	NA
CHAKRABORTY et al, 2012	=	=	=	=	NA	NA	+	+	=	=
ELISEI et al, 2008	+	=	NA	=	=	+	=	=	=	+
FERNANDEZ et al, 2013	=	=	+	+	+	NA	+	=	NA	+
FINKELSTEIN et al, 2012	+	=	+	=	NA	NA	NA	=	NA	=
FRASCA et al, 2008	NA	NA	+	+	=	NA	+	+	NA	+
FUGAZZOLA et al, 2006	+	=	+	+	=	NA	NA	=	=	=
GOUTAS et al, 2008	=	=	NA	=	=	NA	NA	=	NA	=
GU et al, 2009	+	=	+	+	NA	NA	+	=	NA	=
GUAN et al, 2009	=	=	NA	NA	NA	NA	+	+	NA	+
GUERRA et al, 2012	=	=	NA	=	=	NA	=	+	NA	+
HOWELL et al, 2011	=	NA	+	=	NA	NA	+	+	NA	+
ITO et al, 2009b	=	=	=	+	NA	NA	=	=	=	=
JEONG et al, 2013	=	+	+	=	+	NA	+	+	NA	=
JOO et al, 2012	=	=	NA	=	=	=	+	+	NA	+
KANG et al, 2013	=	NA	NA	=	=	NA	=	=	NA	+
KIM, S. J. et al, 2012	=	+	NA	+	=	NA	+	=	NA	=
KIM, S. K. et al, 2011	+	=	NA	=	NA	NA	=	=	NA	NA
KIM, T. Y. et al, 2006	=	+	NA	+	=	NA	=	=	NA	=
KLEIMAN et al, 2013	=	=	+	=	=	NA	+	=	NA	NA
KOPEREK et al, 2012	+	=	+	+	=	+	=	=	+	NA
KURTULMUS et al, 2012	=	+	+	+	+	NA	+	+	NA	NA
LEE, J. U. et al, 2012	=	=	NA	=	=	NA	=	=	=	=
LEE, K. C. et al, 2012	=	=	=	=	=	=	=	=	NA	=
LEE, J. U., 2013	=	+	NA	+	=	NA	+	+	NA	+
LIU, R. T. et al, 2005	=	=	=	=	=	NA	=	=	=	=
LUPI et al, 2007	=	=	NA	NA	+	NA	+	+	NA	NA
MOON, H. J. et al, 2009	=	+	NA	=	NA	NA	=	=	NA	=
MOON, W. J. et al, 2012	=	=	NA	=	=	NA	=	=	NA	=
NAKAYAMA et al, 2007	+	+	NA	=	NA	NA	+	+	=	+
NAM et al, 2012	=	=	=	=	=	NA	+	=	NA	NA
OLER; CERUTTI, 2009	=	=	NA	=	=	NA	+	+	NA	+
O'NEILL et al, 2010	=	=	=	=	=	+	=	=	=	=
PARK, H. S. et al, 2012	=	=	NA	=	=	NA	=	=	NA	NA
PARK, S. Y. et al, 2006	+	=	=	=	+	NA	=	=	NA	NA
PATEL, A. et al, 2011	=	=	NA	+	=	NA	+	+	NA	NA
PELTTARI et al, 2012	=	=	NA	=	NA	NA	NA	=	NA	NA
PYO et al, 2013	=	=	NA	=	=	NA	=	=	NA	=
RIESCO-EIZAGUIRRE et al, 2006	=	=	+	NA	=	NA	+	=	=	+
SAPIO et al, 2006	=	=	NA	=	=	NA	NA	+	=	=
SMITH et al, 2011	=	+	+	=	NA	NA	NA	NA	NA	+
STANOJEVIC et al, 2011	=	=	+	=	=	=	=	=	=	+
SYKOROVA et al, 2010	=	=	+	=	=	=	NA	+	=	+
ULISSE et al, 2012	+	=	=	=	NA	NA	=	=	NA	=
VIRK et al, 2013	=	=	+	=	=	NA	+	+	NA	NA
WANG, W. et al, 2012	+	=	NA	NA	NA	NA	=	=	NA	=
XING et al, 2009	=	=	NA	=	NA	NA	+	+	NA	+
ZAGZAG et al, 2013	=	=	NA	=	=	NA	+	=	NA	NA
ZHENG, X. et al, 2012	+	+	NA	NA	+	NA	+	+	=	NA
ZUO et al, 2007	+	=	NA	=	NA	NA	=	=	NA	=

**Legenda:**  
 (+): Associação positiva      Est. Clín.: estágio clínico      MF: multifocalidade      Sub. Hist.: subtipo histológico  
 (=): Associação nula      Inv. Vasc.: invasão vascular      Meta LN: metástase linfonodal  
 EET: extensão extratireoidiana      Meta DT: metástase à distância      NA: não aplicável

Fonte: Elaborado pela autora. Estudos incluídos na meta-análise de Xin Liu e colaboradores (2014).

## APÊNCIDE D – PROTOCOLO DE REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS

Data:

Nome do pesquisador:

01. **RG:** .....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
02. **Idade:** (anos ao diagnóstico).....|\_|\_|
03. **Sexo:** (1) Masculino (2) Feminino.....|\_|
04. **Histórico familiar de Câncer de Tireoide:** (1) Sim (2) Não (999) Não informado.....|\_|\_|\_|
05. **Data da cirurgia** (00/00/0000).....\_\_/\_\_/\_\_\_\_
06. **Tipo de Cirurgia:** (1) Tireoidectomia parcial (2) Tireoidectomia total (3) Tireoidectomia realizada em outra instituição.....|\_|
07. **Esvaziamento cervical homolateral:** (1) esvaziamento recorrencial (Nível VI) (2) esvaz. radical clássico (3) esvaz. radical modificado (II a V) (4) não esvaziado (5) não especificado (999) ignorado.....|\_|\_|\_|
08. **Esvaziamento cervical contralateral:** (1) esvaziamento recorrencial (Nível VI) (2) esvaz. radical clássico (3) esvaz. radical modificado (II a V) (4) não esvaziado (5) não especificado (999) ignorado.....|\_|\_|\_|
09. **Numero do anátomo-patológico. (999)**.....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
10. **Tipo histológico:** (1) Ca. Papilífero (2) Ca. Folicular (3) Ca. Células de Hurthle (4) Ca. Medular (5) Ca. Anaplásico (6) Outro.....|\_|
11. **Se Carcinoma papilífero, subclassificação:** (1) Clássico (2) Variante Folicular (3) Variante Oncocítica (4) Variante Células Claras (5) Variante Células altas (6) Variante Células Colunares (7) Variante Esclerosante Difusa (8) Variante Sólida (9) Variante Cribiforme (10) Com componente insular (11) Células escamosas ou mucoepidermóide (12) Misto: Papilífero e Medular (13) Outro.....|\_|\_|
12. **Tamanho do maior nódulo AP (mm)**.....|\_|\_|\_|

13. **Tumor multicêntrico:** (1) Não (2) Unilateral (3) Bilateral .....|\_|\_|\_|
14. **Extensão extra-tireoidiana:** (1) Sim (2) Não (999) Ignorado.....|\_|\_|\_|
15. **Invasão vascular:** (1) Sim (2) Não (999) Ignorada.....|\_|\_|\_|
16. **Estadiamento T:** (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (999) Tx ..... |\_|\_|\_|
17. **Estadiamento N:** (1) N0 (2) N1a (3) N1b (4) NX.....|\_|\_|\_|
18. **Data da iodoterapia: (00/00/0000) (999) se não fez.....** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_
19. **Dose de iodo:** (0) Não (1) 30 mCi (2) 100mCi / 3,7Gbq (3) 150mCi / 5,5Gbq (4) 200mCi / 7,4Gbq (5) 250mCi / 9,25 Gbq (6) 300mCi / 11,1Gbq (7) outros .....|\_|
20. **PCI pós iodoterapia:** (1) Captação adequada (2) Metástases à distância (3) Captação inadequada..... |\_|\_|
21. **Metástase à distância na PCI pós-dose:** (1) Não (2) Pulmão (3) Fígado (4) Ossos (5) Outros..... |\_|\_|
22. **Tireoglobulina pós iodoterapia (feita após 3 meses da dose de iodo):** .....|\_|\_|
23. **Recidiva em qualquer momento do followup:** (1) Não (2) local (3) pescoço homolateral (4) pescoço contralateral (5) Linfonodos do nível VI (6) osso (7) fígado (8) pulmão (9) Outros .....|\_|
24. **Status na última informação:** (1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte por câncer (4) morte operatória (5) morte por outra causa (6) perdido de vista.....|\_|

**ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICO  
EM PESQUISA DA ESCOLA DE ENFERMAGEM DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA BAHIA**



ESCOLA DE ENFERMAGEM DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA  
BAHIA



**PROJETO DE PESQUISA**

**Título:** ANÁLISE DA MUTAÇÃO BRAFV600E EM VARIANTES AGRESSIVAS DE CARCINOMA PAPILÍFERO E CARCINOMA ANAPLÁSICO DE TIREÓIDE

**Área Temática:**

Área 1. Genética Humana.

**Versão:** 1

**CAAE:** 03402212.7.1001.5531

**Pesquisador:** Helton Estrela Ramos

**Instituição:** Universidade Federal da Bahia - UFBA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**Número do Parecer:** 102.290

**Data da Relatoria:** 11/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de pesquisa bicêntrica, de fonte secundária envolvendo os estados da Bahia e do Paraná. Tem como objeto a mutação BRAF600E em variantes agressivas de carcinoma papilífero e carcinoma anaplásico de tireóide. É financiado pela FAPESB. Propõe-se a correlacionar a presença da mutação BRAF600E com aspectos citopatológicos e anatomo-patológicos do câncer diferenciado de tireóide, suas variantes mais agressivas, incluindo neoplasias menos diferenciadas, carcinoma anaplásico e os tratamentos instituídos. O autor apresenta seu estudo com a afirmativa de que a maioria dos estudos clínicos e experimentais realizados até o momento tem revelado uma significativa associação da mutação BRAFV600E com agressividade tumoral, recorrência tumoral, resistência ao radioiodo e mortalidade. Assim sendo, a determinação da alteração molecular do gene BRAF, mais especificadamente, da transversão do nucleotídeo T1799A, ou do produto protéico desta mutação, BRAFV600E, poderia ser uma ferramenta auxiliar importante na delicada determinação prognóstica, e potencial determinante no screening de casos potencialmente candidatos a novos agentes terapêuticos como fármacos antagonistas de RAF e da mutação BRAFV600E. Apresenta uma revisão bibliográfica pertinente e atualizada que justifica a realização do estudo no aumento da incidência do câncer de tireóide na população brasileira.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** A presente proposta visa otimizar a análise da mutação BRAFV600E e torná-la factível em nosso meio, acumulando resultados sólidos que permitam referendar a investigação molecular do câncer de tireoide mais agressivo, pouco diferenciado/indiferenciado e resistente ao radioiodo, como um método coadjuvante útil na prática clínica.

**Objetivos Secundários:** - Padronizar a técnica de detecção da mutação BRAFV600E em câncer de tireoide no estado da Bahia; - Determinar a prevalência da mutação somática BRAFV600E em variantes agressivas de CPT, tumores resistentes ao tratamento com radioiodo e carcinoma indiferenciado de tireóide; - Estabelecer correlação entre aspectos clinicopatológicos e positividade da mutação BRAFV600E.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos estão ausentes para o sujeito por se tratar de estudo retrospectivo. Como benefícios o autor apresenta a utilização do marcador prognóstico molecular de identificação da mutação BRAFV600E poderá, possivelmente, promover, por exemplo: a) a indicação de radioiodoterapia em altas doses para tumores de baixa agressividade; b) a realização excessiva de exames e testes diagnósticos em tumores não agressivos; c) identificação de lesões de comportamento biológico mais invasivo; d) intensificação no follow-up de lesões de alto risco de recorrência; e) redução das taxas de recorrência

**Endereço:** Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

**Bairro:** S/N

**CEP:** 75.000-000

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-7615

**E-mail:** cepee.ufba@ufba.br

**ESCOLA DE ENFERMAGEM DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA  
BAHIA**



tumoral; f) redução de mortalidade, uma vez que lesões mais agressivas poderão ser identificadas no pós-operatório imediato e assim a radiiodoterapia, terapia de supressão do TSH com levotiroxina e seguimento clínico serão ajustados ao prognóstico tumoral. Além disso, a mutação BRAFV600E é marcador molecular prognóstico de outros tipos tumorais como melanoma e câncer do sistema digestório, podendo assim, a padronização do método ser útil em outras áreas de pesquisa e especialidades médicas. Um outro ponto importante é que este projeto serve de ponto de partida para a detecção de mutação BRAF em material de punção aspirativa de agulha fina, no estabelecimento de diagnóstico de carcinoma papilífero. Como marcador molecular de carcinoma, este procedimento poderá diminuir o índice de exames citológicos não-conclusivos em material de biópsias de agulha fina de tumores tireoidianos e realizar avaliação prognóstica na fase préoperatória, podendo influenciar na extensão da conduta cirúrgica adotada, e conseqüentemente otimizar o tratamento clínico oferecido aos pacientes na rede hospitalar;

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa relevante para o cuidado a pessoas portadoras de cancer de tireoide que de certo contribuirá para o diagnóstico e tratamento precoce, estabelecendo um padrão de atendimento e contribuindo para a construção do conhecimento sobre esta temática.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A presente proposta dispensa a elaboração do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido uma vez que se trata de um estudo retrospectivo, onde serão colhidos dados presentes em laudos anatomopatológicos, respeitando e garantindo a confidencialidade dos dados dos pacientes. Os documentos obrigatórios solicitados foram anexados a proposta.

**Recomendações:**

NSA

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não apresenta pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

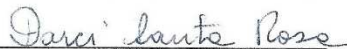
**Necessita Avaliação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Plenário acata o Parecer de APROVADO emitido pelo relator.

SALVADOR, 19 de Setembro de 2012



Assinado por:  
DARCI DE OLIVEIRA SANTA ROSA

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: S/N

CEP: 75.000-000

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br



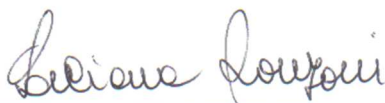
**ANEXO B – APROVAÇÃO DA DIRETORIA MÉDICA DO HOSPITAL  
SÃO RAFAEL**



### APROVAÇÃO DA DIRETORIA MÉDICA

Declaro que conheço o projeto intitulado "**Análise da mutação BRAF<sup>V600E</sup> em variantes agressivas do carcinoma papilífero e carcinoma anaplásico de tireoide**", que tem como Pesquisadores Responsáveis, **Dr. Helton Estrela Ramos**, e **Dr. Cláudio Rogério Alves de Lima**, e que, nosso serviço tem plenas condições de executá-lo conforme o protocolo previsto. Portanto, autorizo a realização do mesmo no **Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular**, do Hospital São Rafael, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Salvador, 15 de Junho de 2012.



**Dra. Liliansa Ronzoni**  
Diretora Médica