



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de Fevereiro de 1808



Monografia

**Rastreo da presença da mutação BRAF^{V600E} em
carcinoma papilífero de tireoide associado à
tireoidite de Hashimoto**

Virna Mendonça Sampaio Lima

Salvador (Bahia)
Março, 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

(elaborada pela Bibl. SONIA ABREU, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

L732 Lima, Virna Mendonça Sampaio
Rastreo da presença de mutação BRAFV600E em carcinoma papilífero de tireoide associado à tireoidite de Hashimoto/ Virna Mendonça Sampaio Lima. (Salvador, Bahia): V M S, Lima, 2017.

VIII, 39p.

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Professor orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos

Palavras chaves: 1. Mutação BRAFV600E. 2. Carcinoma papilífero de tireoide. 3. Tireoidite de Hashimoto. I. Ramos, Helton Estrela. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Rastreo da presença da mutação BRAFV600E em carcinoma papilífero de tireoide associado à tireoidite de Hashimoto.

CDU: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Rastreio da presença da mutação BRAF^{V600E} em carcinoma papilífero de tireoide associado à tireoidite de Hashimoto

Virna Mendonça Sampaio Lima

Professor orientador: **Helton Estrela Ramos**
Orientador tutor: **Fabiane Carrijo**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2016.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Março, 2017

Monografia: *Rastreo da presença de mutação $BRAF^{V600E}$ em carcinoma papilífero de tireoide associado à tireoidite de Hashimoto*, de **Virna Mendonça Sampaio Lima**.

Professor orientador: **Helton Estrela Ramos**
Orientador tutor: **Fabiane Carrijo**

COMISSÃO REVISORA:

- **Helton Estrela Ramos** (Presidente, Professor orientador), Professor Adjunto do Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo**, Professora Adjunta do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Rita de Cássia Saldanha de Lucena**, Professora Adjunta do Departamento de Neurociências e Saúde Mental da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no XII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em 15 de Março de 2017.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar).

Aos Meus Amados Pais, Meu
Irmão, Meus Avós e Meus
Queridos Amigos.

EQUIPE

- Virna Mendonça Sampaio Lima, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA.
Correio-e: virnasampaiolima@gmail.com;
- Helton Estrela Ramos, Instituto de Ciências da Saúde/UFBA;
- Daniele Pessôa Pereira, Instituto de Ciências da Saúde/UFBA;
- Mateus Medeiros, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;
- Fabiane Carrijo, Instituto de Ciências da Saúde/UFBA.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Instituto de Ciências da Saúde (ICS)

HOSPITAL SÃO RAFAEL (MONTE TABOR) – SSA-BA

- Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
- Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do HSR
- Serviço de Medicina Nuclear

FONTE DE FINANCIAMENTO

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: n° APP0040/2011).

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **Helton Estrela Ramos**, por toda atenção, por todos ensinamentos e pelas grandes oportunidades.
- ◆ À **Danielle Pessoa Pereira**, responsável pelo projeto de mestrado maior que originou esse trabalho, por todo apoio, aprendizado e bons momentos.
- ◆ A **Mateus Medeiros**, companheiro de iniciação científica, pela paciência, ensinamentos e bons momentos.
- ◆ A **Fabiane Carrijo**, orientadora tutora, pela atenção e pelas dúvidas sanadas durante a produção deste trabalho.
- ◆ A **Suzy Cavalcante**, tutora de MEDB51, por todas as críticas e sugestões, que muito ajudaram na construção desta monografia.
- ◆ A **Dra. Rita Lucena e Dra. Iguaracyra Araújo**, pelas críticas pertinentes durante a correção deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABELAS	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	4
I. RESUMO	5
II. OBJETIVOS	6
III. REVISÃO DA LITERATURA	
III.1. Câncer de tireoide	7
III.2. Carcinoma papilífero de tireoide	8
III.3. Tireoidite de Hashimoto	9
III.4. Carcinoma papilífero de tireoide e tireoidite de Hashimoto	10
IV. METODOLOGIA	12
V. RESULTADOS	18
VI. DISCUSSÃO	22
VII. CONCLUSÃO	28
VIII. SUMMARY	29
IX. REFERÊNCIAS	30
X. ANEXOS	
Anexo I: Protocolo de revisão de prontuários	35
Anexo II: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa	37
Anexo III: Aprovação da diretoria médica do HSR	39

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I. 6

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.	18
Características gerais dos indivíduos incluídos no estudo	
TABELA 2.	20
Estudo da presença da mutação BRAF ^{V600E} nos 43 indivíduos estudados	
TABELA 3.	20
Estudo da mutação BRAF ^{V600E} em relação à presença de TH	
TABELA 4.	21
Análises univariada e multivariada da associação da mutação BRAF ^{V600E} com achado de TH associado ao CPT	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEP	Conselho de Ética em Pesquisa
CID	Classificação Internacional de Doenças
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
DP	Desvio padrão
HE	Hematoxilina-eosina
HSR	Hospital São Rafael – Monte Tabor
IC	Intervalo de confiança
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LET	Laboratório de Estudo da Tireoide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SAPC	Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia
SCCP	Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
SMN	Serviço de Medicina Nuclear
TH	Tireoidite de Hashimoto
UFBA	Universidade Federal da Bahia

I. RESUMO

RASTREIO DA PRESENÇA DA MUTAÇÃO BRAF^{V600E} EM CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREOIDE ASSOCIADO À TIREOIDITE DE HASHIMOTO.

Introdução: A mutação BRAF^{V600E} é a mais prevalente no carcinoma papilífero de tireoide (CPT) e possui importância na oncogênese e prognóstico. A importância clínica da presença de Tireoidite de Hashimoto (TH) associado ao CPT tem sido estudada, e mais recentemente, a sua associação com a mutação BRAF^{V600E}. **Objetivos:** Avaliar a prevalência da mutação BRAF^{V600E} em CPT associado à TH e sua associação com aspectos clínico-patológicos. **Metodologia:** Estudo retrospectivo de corte transversal unicêntrico com casos consecutivos de CPT de indivíduos tratados no Hospital São Rafael – Monte Tabor, Salvador, Bahia, Brasil. Foi realizada a coleta de dados clínicos e anatomopatológicos mediante revisão de prontuários. Reação em cadeia da polimerase foi realizada para amplificação do exon 15 do gene BRAF a partir de DNA extraído dos tecidos tumorais emblocados em parafina pós-tireoidectomia. A leitura dos resultados da PCR deu-se por eletroforese das amostras obtidas em gel de agarose e a confirmação da mutação BRAF^{V600E} foi feita através de sequenciamento direto. **Resultados:** 43 sujeitos portadores de CPT foram estudados, dos quais 17 (39,4%) possuíam concomitante diagnóstico de tireoidite de Hashimoto. Destes, 7 apresentavam a mutação BRAF^{V600E} confirmada pelo estudo genético realizado, enquanto 10 (66,7%) foram BRAF^{V600E} negativos. A presença dessas duas condições e da mutação BRAF^{V600E} foram confrontadas em análise univariada, resultando em uma associação negativa significativa ($p:0,008$). Em análise multivariada, essa relação mostrou-se independente ($p:0,024$). **Conclusões:** A presença de TH coexistente com o CPT pode ser fator independente de proteção à mutação BRAF^{V600E}.
Palavras-chave: 1. BRAF^{V600E}; 2. Carcinoma papilífero de tireoide; 3. Tireoidite de Hashimoto.

II. OBJETIVO

II.1. Geral:

Determinar a prevalência da mutação BRAF^{V600E} em casos de carcinoma papilífero de tireoide associado à tireoidite de Hashimoto, em indivíduos tratados no Hospital São Rafael – Monte Tabor, Salvador, Bahia, Brasil.

II.2. Específico


Determinar, em casos de carcinoma papilífero de tireoide associado à tireoidite de Hashimoto, a associação da mutação BRAF^{V600E} e aspectos clínico-patológicos.

III. REVISÃO DA LITERATURA

1. Câncer de tireoide

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais frequente em todo o mundo e sua incidência vem crescendo significativamente nos últimos anos, sendo atualmente responsável por cerca 1% de todas as neoplasias malignas¹⁻³. Esse câncer é mais frequentemente diagnosticado entre pessoas do sexo feminino e é mais comum na faixa etária entre 20 e 50 anos de idade⁴. A última estimativa mundial apontou a ocorrência de 300.000 novos casos de câncer de tireoide no mundo em 2012^{5,6}. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para 2016 foi de 5.870 novos casos em mulheres e 1090 novos casos em homens⁷.

Figura I: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%		Cólon e Reto	17.620	8,6%	
Cólon e Reto	16.660	7,8%		Colo do Útero	16.340	7,9%	
Estômago	12.920	6,0%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Estômago	7.600	3,7%	
Esôfago	7.950	3,7%		Corpo do Útero	6.950	3,4%	
Bexiga	7.200	3,4%		Ovário	6.150	3,0%	
Laringe	6.360	3,0%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%	
Leucemias	5.540	2,6%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	

Fonte: INCA, 2016

A situação do câncer de tireoide no Brasil, quanto à sua incidência e mortalidade, se mostra semelhante à situação mundial⁸. Desde a década de 1970, estudos indicam que o número de casos de neoplasias malignas da tireoide vem crescendo em muitos países¹. Há evidências, segundo o Cancer Incidence in Five Continents, publicado em 2007, de que as taxas de incidência destas neoplasias aumentaram cerca de 5 vezes entre os anos de 1973 e 2002^{5,9}. O incremento significativo nas taxas de incidência tem sido atribuído, principalmente, à melhoria das técnicas de detecção dos nódulos tireoidianos e sua malignidade (foco especial para a PAAF – punção aspirativa por agulha fina), além de maior facilidade de acesso a exames de rastreio, como a ultrassonografia^{1,5,8,10}. Apesar do grande aumento de casos de neoplasias da tireoide, a taxa de mortalidade em decorrência da doença nodular

tireoidiana vem sofrendo importante redução no Brasil e no mundo¹⁰. A explicação para a diminuição de tais taxas se baseia fundamentalmente na detecção precoce das malignidades e nos avanços dos seus tratamentos cirúrgicos e adjuvantes⁵.

As neoplasias epiteliais de tireoide podem ser divididas em alguns grupos maiores, neoplasias diferenciadas, não diferenciadas e neoplasias medulares⁸. As neoplasias bem diferenciadas podem ser de dois subtipos: derivadas das células foliculares, carcinomas papilíferos e foliculares, e derivada das células parafoliculares, carcinoma medular da tireoide, que forma seu próprio grupo na classificação^{8,11}. A forma indiferenciada do tumor é classificada como carcinoma anaplásico de tireoide, também derivado de células foliculares^{3,8}.

2. Carcinoma papilífero de tireoide

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) constitui o histotipo mais prevalente das neoplasias de tireoide, podendo representar cerca de 90% delas¹¹. O CPT é uma neoplasia de alto índice de cura, com sobrevida em 10 anos maior que 90%¹².

O CPT é, normalmente, uma doença indolente e de curso crônico¹³. O curso clínico e o prognóstico variam com uma série de aspectos clínico-patológicos relacionados com a agressividade da doença, caráter metastático e potencial de recidiva. Existem muitas variantes histológicas do CPT, e algumas delas, como a variante de células altas, a variante de células colunares e a esclerosante difusa, apresentam maior agressividade e são reconhecidas como neoplasias de maior grau de malignidade¹⁴. As características clínico-patológicas mais relevantes no prognóstico incluem idade menor que 20 e maior que 60 anos, sexo masculino, extensão extracapsular do tumor, invasão vascular e presença de metástases (loco-regional ou à distância)^{14,15,16}.

Essas características clínico-patológicas e a progressão da doença se relacionam muitas vezes com alterações genéticas, que podem promover a carcinogênese por gerar desequilíbrio entre os fatores oncogênicos e supressores tumorais¹⁵. A formação de um tumor depende da proliferação desordenada de células, que resulta do aumento da quantidade de fatores de crescimento ou de transcrição, da maior expressão de seus receptores ou de alterações em cadeias de sinalização intracelular¹⁵.

Molecularmente, o CPT está fortemente relacionado a algumas alterações genéticas, havendo evidências de que cerca de 70% destas neoplasias apresentam

mutações que provocam ativação constitutiva da via MAPK (mitogen-activated protein kinase)¹⁵. Essa ativação decorre de rearranjos no gene RET/PTC ou de mutações pontuais nos genes RAS ou BRAF¹⁵.

A mutação pontual no oncogene BRAF no códon V600E é a mutação mais comum em CPT, estando presentes em 30-80% dos casos de CPT^{14,17}. O gene em questão codifica uma proteína, BRAF, que é uma serina-treonina quinase, da família RAF¹⁸. A mutação referida promove a ativação do gene BRAF e a produção de uma variante constitutivamente ativa dessa proteína, devido a uma substituição de um aminoácido na cadeia protéica, valina por ácido glutâmico na posição 600 da cadeia (V600E)¹⁹. Essa ativação constitutiva é a responsável pela ativação consequente da via MAPK e sua relação com surgimento e comportamento de neoplasias^{19,20}.

A mutação do gene BRAF está associada a uma gama de neoplasias humanas, dentre as quais podemos destacar os melanomas e os CPT²¹. Em relação às neoplasias de tireoide, alguns estudos trazem que a mutação BRAF é quase que exclusiva deste tipo de carcinoma, não se fazendo presente em outros tipos de carcinomas diferenciados¹⁹.

Muitos estudos relacionam positivamente a presença dessa mutação com aquelas características clinico-patológicas que indicam a progressão mais maligna da doença e que são relacionadas com sua recorrência¹⁴. Essa mutação é, também, associada diretamente com a progressão clínica da doença, recorrência e pior resposta ao tratamento^{14,17}.

3. Tireoidite de Hashimoto

A tireoidite de Hashimoto (TH) ou tireoidite linfocítica crônica foi primeiramente descrita em 1912. Trata-se de uma doença auto-imune caracterizada por infiltração crônica e difusa do parênquima tireoidiano por linfócitos, que pode evoluir para fibrose e atrofia da glândula^{17,22,23}. A TH é cerca de 15 vezes mais comum em mulheres e a faixa etária de diagnóstico varia principalmente entre os 30-50 anos de idade⁴. Esta patologia, cuja incidência vem crescendo mundialmente, é a principal causa de hipotireoidismo na população com oferta de iodo normal, excluindo-se hipotireoidismo secundário a tireoidectomia^{18,22,24}.

A TH se desenvolve como consequência de uma interação entre fatores genéticos e ambientais que culminam na deficiência de regulação do sistema imune dos

indivíduos e consequente falha na atividade de linfócitos T supressores na destruição de linfócitos sensibilizados por antígenos próprios tireoidianos^{23,25}. A resposta imune autorreativa é desencadeada por evento inflamatório inicial com exposição dos auto-antígenos em pacientes susceptíveis geneticamente⁴. A presença desses antígenos próprios culminam, então, na atividade citotóxica de células natural killer e na interação entre linfócitos T e B com consequente produção de auto-anticorpos contra o tecido glandular²³.

A TH à microscopia se caracteriza pela presença de infiltrado difuso crônico linfocítico, plasmocitário e de macrófagos, podendo haver ou não fibrose e atrofia do parênquima glandular^{4,23}. Clinicamente, em consequência do processo inflamatório, os pacientes portadores dessa doença podem apresentar aumento do volume glandular e, devido à destruição de parênquima e fibrose, um quadro de hipotireoidismo. O diagnóstico de TH é sustentado em pacientes que apresentam bócio e hipotireoidismo na presença de auto-anticorpos anti-tireoide ou então por confirmação microscópica²⁶.

4. Carcinoma papilífero de tireoide e tireoidite de Hashimoto

Desde 1955, quando Dailey e colaboradores estabeleceram associação entre TH e CPT, demonstrando que 17,7% dos pacientes com CPT eram também portadores de TH, muitos estudos seguindo essa linha de pesquisa se iniciaram^{4,27}. Contudo, até os dias de hoje, a relação entre essas patologias ainda não é bem definida, uma vez que existem muitos dados controversos^{18,22}. Trabalhos recentes ainda apontam a incerteza quanto à relação etiológica entre essas doenças, no sentido de que não é bem estabelecido se a TH favorece o surgimento do CPT ou se este precipita a tireoidite²⁸. Alguns estudos indicam que a presença de TH pode atuar aumentando os riscos de desenvolvimento deste carcinoma²².

Outra tendência da literatura é que a TH se caracteriza como fator protetor, uma vez que os casos de CPT com TH concomitantes foram descritos como menos agressivos, sendo menos associados a extensão extratireoidiana, metástases locais e recidivas²².

A associação entre TH e CPT se amplia ainda mais, abrangendo, além desses aspectos clínico patológicos de malignidade e agressividade, estudos de base moleculares. Muitos estudos mostram associação entre TH+CPT e a presença da mutação BRAF^{V600E}. Apesar de ainda não bem estabelecida na literatura, a presença de

TH pode estar relacionada com menor frequência da mutação BRAF^{V600E} e favorecer, então, a forma menos agressiva do carcinoma, uma vez que essa mutação é considerada fator independente de prognóstico negativo para o CPT^{22,24}.

O presente estudo mostra-se relevante para a comunidade científica, uma vez que visa analisar a relação entre TH e CPT, duas doenças de prevalência e incidência consideráveis na sociedade. Além disso, esse estudo se propõe a associar fatores genéticos (mutação BRAF^{V600E}) e clínico-patológicos (TH) em relação ao CPT, o que promoverá maior conhecimento sobre a neoplasia maligna em questão.

IV. METODOLOGIA

População de estudo e procedimentos de coleta de dados

Este trabalho surge como um subprojeto de um trabalho mais amplo realizado em 2014 para uma dissertação de mestrado sob o título de “Análise da Mutação BRAF^{V600E} em Carcinoma Papilífero de Tireoide”. É, portanto, um estudo desenvolvido a partir da coleta de dados secundários oriundos de um estudo retrospectivo de corte transversal unicêntrico com casos consecutivos de CPT de indivíduos tratados no Hospital São Rafael – Monte Tabor (HSR), localizado na cidade de Salvador, Bahia, no período de janeiro de 2012 a janeiro de 2014. O HSR conta com serviços de referência para o diagnóstico e tratamento do câncer de tireoide, o Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (SCCP/HSR), Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do HSR (SAPC/HSR), e o Serviço de Medicina Nuclear (SMN/HSR).

A seleção de casos iniciou-se com identificação de sujeitos diagnosticados com neoplasia maligna de tireoide (código C73, segundo a Classificação Internacional de Doenças - CID) através do sistema eletrônico interno de base de dados do SAPC/HSR. A população de referência para o estudo incluiu apenas os sujeitos identificados através deste banco de dados eletrônico que haviam sido diagnosticados com CPT e tratados cirurgicamente (por meio de tireoidectomias parciais ou totais) no HSR. Uma população de 544 pacientes resultou dessa seleção.

Realizou-se a busca dos blocos de parafina desses indivíduos, os quais continham o tecido tumoral ressecado cirurgicamente e fixado em formalina, além das lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE), previamente confeccionadas na época do diagnóstico anatomo-patológico. Nos casos em que as lâminas estavam ausentes ou inadequadas para avaliação microscópica, novas lâminas foram confeccionadas e coradas com HE. As lâminas obtidas foram submetidas a uma revisão cega por dois médicos patologistas, da mesma instituição, para confirmação diagnóstica de CPT.

Do total de 544 casos, 183 não foram incluídos no estudo devido às seguintes razões: 7 laudos anatomopatológicos estavam ausentes; 144 casos tratavam-se de microcarcinomas papilíferos; e a localização dos blocos parafinados contendo o tecido tireóideo ressecado cirurgicamente não foi possível em 32 casos. Restaram ao final dessa busca 361 indivíduos, cujos prontuários físicos e/ou eletrônicos foram encaminhados para revisão. Esta revisão obedeceu a um protocolo previamente

estabelecido (anexo 1), que foi elaborado por uma equipe de médicos colaboradores do estudo, experientes nesta área de atuação e de diferentes especialidades (endocrinologia, cirurgia de cabeça e pescoço, patologia clínica e medicina nuclear). Este protocolo preconizava a coleta de dados clínicos e anatomopatológicos relevantes, a qual foi efetuada por pessoal treinado para este fim. Os protocolos revisados foram numerados, para preservar o sigilo e a identidade pessoal dos pacientes, e armazenados em caixa-arquivos no Laboratório de Estudo da Tireoide, no Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, (LET/ICS). Posteriormente, foi realizada a sistematização das informações coletadas em um banco de dados através do pacote estatístico *SPSS Statistics for Windows, Version 22.0* (IBM, Armonk).

A partir da análise do banco de dados desenvolvido na pesquisa, notou-se que 53 pacientes não possuíam estadiamento tumoral completo (TNM), o que os tornava inelegíveis para o estudo. Em consequência a essa exclusão, a população de estudo se constituía nesse momento de 308 pacientes.

A partir da população de referência foi realizado o cálculo do tamanho amostral, que se baseou em uma taxa de prevalência média de 56,3% da mutação BRAF^{V600E} em CPT observada em metanálise realizada em 2014 por Xin Liu e colaboradores. O tamanho do universo amostral considerado para o cálculo foi o número de casos de CPT diagnosticados no HSR durante o período já citado anteriormente entre 2012 e 2014 (544 casos). O número de casos obtidos após cálculo amostral foi de 224, tendo em vista o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Assim, dentro do universo restante de 308 pacientes, houve a seleção de 224 casos consecutivos de CPT.

Buscou-se, em seguida, a obtenção das amostras tumorais dos 224 casos selecionados. Foi realizada a identificação microscópica da área tumoral e marcação direta desta área na lâmina corada. As amostras de tecido parafinado foram obtidas por meio de cortes histológicos de espessura de 10µm de cada caso/bloco para confecção de novas lâminas. A coleta do material decorreu através da sobreposição da lâmina corada e demarcada previamente com as novas de 10µm e dissecação manual de cada uma delas, com navalha estéreis e descartáveis. Os dois tipos de material coletados (parte tumoral e parte não tumoral) foram colocados em dois eppendorfs autoclavados e identificados separadamente, tendo sido feitas duplicatas para cada caso. Para essa análise, foram coletados amostras (tumorais e não tumorais) de 135/224 casos (60,2%).

O passo seguinte se baseou na avaliação da mutação BRAF^{V600E}, processo que dependeu da realização inicial de desparafinização da amostra, seguida da extração de DNA genômico e amplificação pela reação de PCR (*polymerase chain reaction*). A extração do DNA foi feita seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante do *Puregene Core Kit B* (Maryland, QIAGEN Sciences). Do volume obtido, 2µl foram utilizados para análise da pureza do DNA (A260/A280) e de sua concentração (ng/µl) através do aparelho Nano Espectrofotômetro KASVI Modelo 23-0002. As amostras de DNA foram estocadas em freezer -20°C até início das demais análises.

A padronização da técnica de PCR dependeu do desenho prévio dos primers a serem utilizados no processo. Os primers desenhados foram descritos por Kimura e colaboradores (2003), sendo eles complementares às sequências nucleotídicas anterior e posterior (respectivamente alvos do *primer sense* e *antisense*) do exon 15 do gene BRAF descrito na sequência de referência disponível no Genbank (banco de dados de sequências genéticas disponível no *National Center for Biotechnology Information - NCBI*) sob o código NG_007873.3. Para a padronização foram levados em conta: quantidade de DNA molde; concentração dos primers; temperatura de pareamento dos primers; concentração do reagente cloreto de magnésio; e número de ciclos no termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystem, Foster City). Sendo assim, a amplificação do exon em questão aconteceu mediante uso de 5-100ng/ml de DNA genômico em volume total de 20µl, contendo 7.5pmol de *primers sense* e *antisense* (Invitrogen, Carlsbad), 100µl de dNTPs, 2,0mM de MgCl₂, Platinum Taq DNA polimerase *high fidelity*, tampão e água de PCR (Invitrogen, Carlsbad). A PCR foi realizada com etapa inicial de desnaturação a 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.

A leitura dos resultados da PCR deu-se por eletroforese das amostras obtidas em gel de agarose a 1,5%, preparado com *UltraPureTM Agarose* (Invitrogen, Carlsbad) diluída em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X (*UltraPureTM Buffer*, Invitrogen, Carlsbad) e acrescida de 0,1µl/ml de *Sybr Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Carlsbad). O gel de agarose com as amostras era submetido a uma corrente de 90V durante 45 minutos em sistema de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia, Modelo LCH 13x15, Cotia). Uma posterior análise do gel em transiluminador *Safe Imager 2.0 Blue*

Light (Invitrogen, Carlsbad) determinava o sucesso da PCR quando da visualização de bandas únicas contendo 231bp.

Em casos de ausência de amplificação do éxon 15 do gene BRAF, novas extrações de DNA genômico a partir das duplicatas foram realizadas, dessa vez utilizando protocolos específicos para extração de DNA a partir de tecidos parafinados (*QIAamp FFEE Tissue Kit* –Maryland, QIAGEN Sciences– e *ReliaPrepTM gDNA Miniprep System* –Madison, Promega–). Após reextrações, as amostras obtidas passaram pelas mesmas etapas de amplificação e análise dos resultados da PCR já descritas.

Das 135 amostras coletadas, a maioria dos casos elegíveis para o estudo (92/135; 68,1%) apresentou amostras inadequadas para a realização de análise molecular, ainda que reextrações com *kits* específicos para tecidos parafinados tenham sido realizadas. Apesar da concentração de DNA (>100ng/mL) e razões 260/280 adequadas (1.8-2.0), não houve amplificação do éxon 15 do gene BRAF em 92 amostras.

Assim, só foi possível a análise da mutação BRAF^{V600E} em amostras tumorais de 43 pacientes. Para confirmação da existência de mutação BRAF^{V600E} as amostras positivas foram submetidas a purificação através de colunas do *Purelink Quick PCR Purification Kit* (Invitrogen, Carlsbad) e a sequenciamento direto em placas utilizando 2,5pmol dos *primers* (*foward* e *reverse*) e reagentes do *BigDye® Terminator v2.1 Cycle Sequencing Kit* (Invitrogen, Carlsbad). A precipitação da reação de sequenciamento deu-se através da utilização de solução de isopropanol 70% e com adição de *Hi-DiTM Formamide* (Applied Biosystem, Foster City). Em seguida, as amostras foram injetadas em sequenciador automático multicapilar *ABI PRISM XL3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem, Foster City), localizado na plataforma de sequenciamento do ICS/UFBA.

As sequências de DNA obtidas foram visualizadas através de eletroferogramas gerados pelo sequenciador utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.2. A análise deu-se mediante comparação das sequências obtidas com as sequências de referência contidas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). A similaridade se confirmou pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível pelo NCBI. A positividade da mutação BRAF^{V600E} foi confirmada com a presença da alteração T1799A em heterozigose ou em homozigose nos eletroferogramas avaliados.

Variáveis

As variáveis escolhidas para serem utilizadas na caracterização da população do presente estudo, quanto às suas características clínicas e patológicas, foram 12. Sexo, idade e histórico familiar de câncer de tireoide são as variáveis que proporcionam conhecimento sobre as características clínicas dos participantes. Quanto aos dados histopatológicos, foram escolhidos os seguintes: subtipo histológico da neoplasia, tamanho do tumor, presença de tireoidite de Hashimoto, multifocalidade, invasão vascular, extensão extratireoidiana, metástase linfonodal, metástase à distância e estadiamento tumoral TNM.

Para a análise mais aprofundada e concretização dos objetivos aos quais se propõe este estudo, as variáveis foram a presença de tireoidite de Hashimoto e a presença da mutação BRAF^{V600E}, que foram confrontadas e submetidas a análises uni e multivariadas.

Análise estatística

Os casos incluídos no estudo (43) foram divididos em dois grupos de comparação: pacientes com diagnóstico concomitante de TH e CPT e outro grupo de pacientes com CPT e sem diagnóstico de TH. Posteriormente fez-se a comparação estatística referente à presença da mutação BRAF^{V600E} associado a CPT em relação à exposição à TH e à não exposição.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *SPSS Statistics for Windows, Version 22.0* (Armonk, IBM). A positividade da presença da mutação foi confrontada com a existência de tireoidite de Hashimoto e CPT, através de Teste de Qui quadrado e o Teste Exato de Fisher. Regressão logística multivariada foi utilizada para identificar possíveis associações independentes. Valores de odds ratio (OR) foram determinados para investigar a intensidade das associações. Os resultados dessa associação foram considerados estatisticamente significantes com base no valor de $p \leq 0,05$ em intervalos de confiança de 95%.

Aspectos Éticos

O estudo se guiou pela declaração de Helsinki de 1989 e pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde ao tratar de pesquisas envolvendo seres humanos. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Enfermagem da Universidade Federal da Bahia após submissão do projeto no sistema

eletrônico da Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos. Após análise e aprovação do projeto pelo CEP (Anexo 2), a participação do HSR foi consentida pela Diretoria Médica da instituição (Anexo 3).

Não houve necessidade de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido porque o estudo foi realizado por meio de análise de laudos de pacientes já diagnosticados e tratados, e o material usado foi proveniente de micro-cortes dos blocos de parafina dos pacientes. Pode-se ainda lembrar que o sigilo de todas as informações foi respeitado durante todo o curso da pesquisa.

V. RESULTADOS

As características gerais, incluindo todos os dados clínico-patológicos dos 43 pacientes analisados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Características gerais dos indivíduos incluídos no estudo

Características	N (%)
Total = 43	
Dados clínicos	
Idade (anos)	
Média ± DP ¹	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)
Sexo	
Feminino	40 (93)
Masculino	3 (7)
História familiar de câncer de tireoide	6 (14)
Dados histopatológicos	
Subtipo histológico	
Forma clássica	32 (74,4)
Variante folicular	8 (18,6)
Variante de células altas	1 (2,3)
Variante oxifilica	1 (2,3)
Variante trabecular	1 (2,3)
Tamanho tumoral (mm)	
Média ± DP	19,23 ± 11,36
Amplitude	5-50
≤ 10mm	11 (25,6)
> 10mm	32 (74,4)
< 20mm	21 (48,8)
21-39mm	7 (16,3)
≥ 40mm	4 (9,3)
Tireoidite de Hashimoto	17 (39,4)
Multifocalidade	23 (53,5)
Invasão vascular	3 (7)
Extensão extratireoidiana	3 (7)
Metástase linfonodal	18 (41,9)
Metástase à distância	2 (4,7)
Estadiamento tumoral (TNM)²	
I/II	37 (86)
III/IV	6 (14)

¹ DP: desvio padrão. ² TNM (AJCC, 2010)

O presente estudo analisou os dados referentes a 43 pacientes portadores de CPT, sendo em sua maioria pacientes do sexo feminino (40/43; 93%). Os pacientes incluídos estavam entre 12 e 78 anos de idade, a maioria deles, 34, tinham menos de 45 anos de idade (79%). Ao dividir os pacientes em três faixas etárias, com 21 anos ou menos, entre 22-44 anos de idade e com ou maiores de 45 anos, percebeu-se que nesta população, a parte mais significativa, 29 pacientes, se enquadrava na faixa entre 22 e 44 anos (64,7%). A média de idade entre os participantes do estudo foi de 37,04, com desvio padrão de $\pm 13,58$. Ainda sobre os dados clínicos dos participantes da pesquisa, 6 deles possuíam histórico familiar de câncer de tireoide, o que representa 14% dessa amostra.

Quanto aos dados histológicos, a variante histológica predominante foi a forma clássica do carcinoma papilífero de tireoide, diagnosticada em 32 pacientes, o equivalente a 74,4% da amostra em questão. A variante folicular foi encontrada em 8 pacientes, 18,6% dos casos, e as demais variantes encontradas, de células altas, oxifílica e trabecular, foram responsáveis, cada uma delas, por apenas 1 dos casos, 2,3%.

Quanto ao tamanho tumoral, a média foi de 19,23mm, tendo ocorrido uma variação de tamanho de 5 a 50mm, com a maioria dos tumores, 32 (74,4%) medindo mais que 10mm. Em 48,8% dos casos os tumores tinham tamanhos entre 10 e 20mm, e apenas 4 casos, 9,3%, foram de tumores maiores que 40mm. Parcela significativa das amostras, 11 casos, mostraram tumores menores que 10mm.

Tireoidite de Hashimoto foi diagnosticada em 17 pacientes do estudo, com prevalência amostral de 39,4%.

Algumas características de agressividade tumoral, como multifocalidade, invasão vascular, extensão extratireoidiana, metástase linfonodal e à distância também foram analisadas. Multifocalidade esteve presente em pouco mais de metade dos pacientes, 53,5% deles. Metástase linfonodal acometeu 41,9% dos pacientes analisados. Invasão vascular, extensão extratireoidiana e metástase a distância apresentaram as seguintes prevalências, respectivamente: 7%, 7% e 4,7%.

Quanto ao estadiamento, de acordo com a classificação TNM, a maioria dos pacientes estudados, 37 (86%), foi classificada como portadores de doença em estádios clínicos I e II, enquanto 6 pacientes, 14%, foram classificados em estádios clínicos avançados, III e IV.

Tabela 2. Estudo da presença da mutação BRAF^{V600E} nos 43 indivíduos estudados

Amostras com amplificação efetiva do exon 15 do gene BRAF	BRAF +	BRAF -
43	28(65,12%)	15(34,88%)

Das 43 amostras coletadas, a amplificação do éxon 15 do gene BRAF indicou, após análise da PCR e sequenciamento, a positividade para a mutação estudada, BRAF^{V600E}, em 28 (65,12%) dos casos – Tabela 2.

Tabela 3 – Estudo da mutação BRAF^{V600E} em relação à presença de TH.

Variável	BRAF +	BRAF –	Valor de <i>p</i>
	(28)	(15)	(Teste de Qui quadrado)
CPT+TH (17)	7	10	0,008
CPT s/ TH (26)	21	5	

Como já relatado na tabela 1, os dados obtidos pela revisão de lâminas da peça cirúrgica de cada indivíduo estudado permitiu a confirmação do diagnóstico de TH em associação ao CPT. No total, 17 pacientes (39,4%) com CPT possuíam concomitante diagnóstico de TH. Desses 17 pacientes portadores de TH, 7 deles apresentaram mutação BRAF^{V600E} confirmada pelo estudo genético realizado, enquanto 10 (58,82%) foram BRAF^{V600E} negativo. Quando comparados os grupos com e sem TH, percebeu-se que a mutação BRAF^{V600E} foi positiva em 41,2% dos casos de CPT+TH, enquanto a mutação ocorreu em 80,8% dos casos de CPT sem TH.

Os dados sobre a presença de TH e CPT e a presença de mutação BRAF^{V600E} foram confrontados e, por meio da realização de análise univariada, foi obtida a significância estatística dessa relação, com $p=0,008$ (tabela 3).

A tabela 4 apresenta associações observadas entre a presença da mutação BRAF^{V600E} e o achado de TH associado ao tumor papilífero. A relação encontrada após análise univariada mostrou-se negativa, como já referida inclusive, e, após análise

multivariada, com ajuste para idade, tamanho tumoral, extensão extratireoidiana e metástase linfonodal, essa relação permaneceu significativa ($p=0,024$).

Tabela 4. Análises univariada e multivariada da associação da mutação BRAF^{V600E} com achado de TH associado ao CPT.

Mutação BRAF ^{V600E}						
Análise univariada				Análise multivariada		
Variáveis	OR <i>bruto</i>	IC 95%	Valor de <i>p</i>	OR <i>ajustado</i>	IC 95%	Valor de <i>p</i>
TH*	0,16	0,04-0,65	0,008	0,14	0,02-0,77	0,024

Para análise univariada:

Teste de Qui Quadrado e Teste Exato de Fisher.

Para análise multivariada:

* TH ajustado para idade, tamanho tumoral, extensão extratireoidiana e metástase linfonodal.

VI. DISCUSSÃO

1. População do estudo, suas características clínico-patológicas e a mutação BRAF^{V600E}

Metanálise realizada por Li e colaboradores em 2012, traz a análise de trinta estudos, com total de 5238 pacientes, dos quais 81,06% eram mulheres²⁹. Estudo realizado por Silva em 2012 em Goiás, no Brasil, teve 76% da casuística total pertencente ao sexo feminino³⁰. De modo geral, mesmo que haja variação do valor percentual entre os estudos, a literatura mostra uma predominância marcante da incidência do CPT neste sexo, o que é compatível com o que foi constatado em nossa população de estudo onde 93% de pacientes foram do sexo feminino^{31,32}.

Em relação à idade, a maioria dos pacientes estudados, 67,4%, tinham entre 22-44 anos. A idade mais comum de incidência do câncer de tireoide varia dos 20 aos 50 anos de idade⁴. Em alguns estudos que correlacionam a mutação BRAF^{V600E} com a presença de TH, a casuística se apresenta com idade mais avançada, com 51,8 a 57,42% dos pacientes com mais de 45 anos^{29,32}. Contudo, características relativas ao perfil epidemiológico local podem justificar essas diferenças. No estudo brasileiro de Silva, a média de idade entre os pacientes portadores de CPT foi de 36,8 anos, com 72,41% dos pacientes com menos de 45 anos, perfil que se assemelha ao encontrado por nós³⁰.

Uma minoria dos pacientes estudados, apenas 14% deles, apresentou histórico familiar positivo de câncer de tireoide. Estudo realizado por Ito e colaboradores publicado em 2009, unicêntrico, que analisou 6015 casos de CPT entre os anos de 1987 e 2004, mostrou uma prevalência de apenas 4,5% de histórico familiar de neoplasia tireoidiana³³.

Em relação aos subtipos histológicos, 74,4% dos casos estudados de CPT se apresentaram em sua forma clássica, enquanto 18,6% foram diagnosticados como variante folicular. Neste estudo tivemos apenas 1 caso de cada uma das seguintes variantes mais raras: variantes de células altas, oxifílica e trabecular. Segundo Michel e colaboradores, que analisaram casos de 674 pacientes entre os anos de 1960-1998, a forma clássica foi a mais prevalente, sendo responsável por 74% dos casos, enquanto as variantes de células altas e oncocítica representaram, respectivamente, 8,3% e 3,5% dos casos³⁴. As variantes clássicas e foliculares, as mais frequentes, possuem, em geral, prognóstico favorável, enquanto outras variantes mais raras, como as de células altas,

possuem relação com prognóstico menos desejado. Contudo, essa associação como fator de risco independente é fraca segundo a maioria dos estudos^{34,35}.

Em relação ao estadiamento, 86% dos pacientes foram classificados como portadores de doença em estádios clínicos I e II, enquanto 14% foram classificados em estádios clínicos avançados, III e IV. Em estudo retrospectivo, Loh e colaboradores mostraram predominância dos estádios I e II em pacientes diagnosticados com CPT, uma vez que, de 700 pacientes analisados, 516 e 57 indivíduos, integravam, respectivamente, estágio I e II da classificação TNM³⁶.

Estudos apontam que a mutação V600E do gene BRAF é a mutação mais prevalente nos casos de CPT, estando presente em cerca de 44% dos casos, superando outras mutações oncogênicas³⁷. Alguns estudos referem que a prevalência da mutação varia de 29-83% em diferentes séries de casos de CPT³⁸. A prevalência encontrada por nós foi de 65,12%.

Em metanálise recente, de 2014, Xin Liu e colaboradores analisaram 69 estudos, que englobavam um total de 14.170 casos de CPT, buscando estabelecer relação entre a mutação em questão e aspectos patológicos do CPT. A prevalência da mutação variou de 27.3 a 90.2 %, com média de 56,3%. Nesse trabalho, foram selecionados, dentre outros critérios, apenas aqueles que se utilizaram do método de sequenciamento direto para confirmação da mutação, mesmo método utilizado em nosso trabalho³⁷.

Em estudo nacional realizado por Silva em 2012, foi encontrada prevalência de 63,37% da mutação BRAF^{V600E} em casuística de 116 pacientes. Assim como o presente estudo, utilizaram material fixado em formalina e emblocado em parafina, não se valendo, contudo, de sequenciamento direto para confirmação da mutação³⁰.

Nossa análise englobou vieses que poderiam tanto superestimar a frequência da mutação quanto subestimá-la. As dificuldades encontradas que culminaram em uma amostra final muito menor que a objetivada, a perda da característica randomizada da amostra e o próprio fato de ser uma análise retrospectiva podem ter favorecido a seleção de casos mais agressivos, que são em geral associados à mutação BRAF^{V600E}³⁷. Por outro lado, este estudo fez uso do método de sequenciamento direto para confirmação da presença da mutação, método considerado mais preciso, porém menos sensível, para análise de alterações genéticas, especialmente polimorfismos de nucleotídeo único³⁹. Desse modo, levando esses fatos em consideração e constatando que a taxa de

prevalência da mutação BRAF^{V600E} se aproxima de taxas encontradas em outros estudos semelhantes na literatura, acreditamos que a frequência observada nesse estudo represente bem a realidade.

Tendo em vista as análises anteriores, conseguimos deduzir que as características gerais da população do estudo estão em conformidade com o que é encontrado na literatura, e que esta população tem características que reproduzem o que encontramos em uma realidade ampliada.

2. Tireoidite de Hashimoto, carcinoma papilífero de tireoide e mutação BRAF^{V600E}

A relação entre inflamação e neoplasia é bem estabelecida em alguns órgãos e tecidos, contudo, na tireoide ainda há incertezas, sendo improvável a ideia da TH como uma condição de predisposição neoplásica^{4,22,40}. Estudos como os de Dailey em 1955, Camandaroba et al. em 2009, Larson et al, Okayasu et al e Gul et al apontam no sentido de que a TH aumenta a chance de desenvolvimento de CPT, mostrando porcentagem importante de casos de câncer diferenciado de tireoide, de 23,5-45%, relacionados com a presença de tireoidite linfocítica crônica⁴. Dados na literatura mostram ainda que a chance de desenvolvimento de malignidade é 9-40% maior em nódulos de pacientes com tireoidite autoimune do que em nódulos não associados a essa condição⁴¹. Segundo Fiore e colaboradores, o aumento secundário de TSH existente nos pacientes portadores de processos autoimunes pode justificar o risco aumentado de neoplasia, uma vez que o TSH é fator de risco para desenvolvimento de malignidades^{31,42}. Outra hipótese proposta para aumento de risco de malignidade envolve a ideia de que o ambiente de inflamação criado pela reação autoimune forneça substâncias que estimulem o desenvolvimento de tumores e proliferação celular³¹. A relação entre essas duas condições é ainda embasada em semelhanças bioquímicas, histoquímicas e patológicas, com foco notável para mutações no oncogene RET/PTC⁴³. Seguindo essa linha da literatura, a vigilância mais específica no rastreamento de CPT em pacientes portadoras de TH é estimulada por alguns autores⁴⁴.

Em contrapartida, outros estudos, como os de Mazokopakis et al, Repplinger et al e Del Rio et al, desconstruem essa relação à medida que não encontram relevância estatística na relação causal entre essas duas patologias⁴. Em estudo prospectivo publicado em 2010, Anil e colaboradores analisaram 164 pacientes com nódulos tireoidianos e inferiram não haver diferença entre incidência de malignidade em

pacientes com TH e sem esse diagnóstico⁴⁵. Um ponto importante a ser notado é que esse estudo foi integrado por uma população cujos nódulos em sua maioria não possuíam indicação cirúrgica, portanto, com menos aspectos de malignidade, ao contrário de grande parte dos estudos citados anteriormente, de cunho retrospectivo e com enfoque maior em análise de peças cirúrgicas.

A associação entre existência de TH associada ao CPT foi extrapolada para análise mais aprofundada sobre os possíveis desfechos clínicos e interferência em prognóstico da neoplasia. Muitos estudos trouxeram que essa condição autoimune favorecia o desfecho do CPT, uma vez que foi associada a melhores prognósticos, com menor progressão da doença, menor probabilidade de metástase e recorrência^{22,31,46}. Análises genéticas também passaram a ser pesquisadas e a associação TH e CPT foi relacionada também com a presença da mutação BRAF^{V600E}, marcador biomolecular independente de prognóstico desfavorável³¹. Essa relação, contudo, ainda não é bem elucidada na literatura.

Em relação à TH, nosso estudo constatou que 39,4% dos pacientes possuíam concomitante diagnóstico de CPT e TH. Quando confrontamos esse dado com a presença ou ausência de mutação BRAF^{V600E}, obtivemos uma associação negativa estatisticamente significativa, com valor de $p=0,008$. A mutação BRAF^{V600E} foi positiva em 41,2% dos casos de CPT+TH, enquanto a mutação ocorreu em 80,8% dos casos de CPT sem TH. Análise multivariada realizada também foi significativa, confirmando que essa associação era independente de outros fatores.

Variados estudos mostram associação semelhante à encontrada neste trabalho. Estudo realizado em 2009 por Kim e colaboradores analisou 101 pacientes com diagnóstico de CPT, dentre os quais 64 eram portadores de TH (63,4%) e 37 (36,6%) não possuíam esse último diagnóstico. Quando analisados em relação à mutação BRAF^{V600E}, 61 dos 64 pacientes que possuíam diagnóstico apenas de CPT sem TH foram positivos para essa mutação, enquanto apenas 27 dos 37 pacientes com diagnóstico de CPT+TH eram BRAF positivos. A associação desse estudo se mostrou significativa estatisticamente com valor de $p=0,003$ ³².

Estudo realizado por Zeng e colaboradores recentemente, em 2015, na China, analisou 619 pacientes submetidos a tireoidectomia, entre os anos de 2009 e 2014. As análises moleculares se deram a partir de tecido fresco e método de sequenciamento direto foi realizado para identificar e confirmar as mutações. A prevalência de TH na

amostra desse trabalho foi de 35,9% e da mutação BRAF^{V600E} foi de 75,1%. A partir de regressão logística multivariada, a TH foi forte fator protetor independente para esta mutação ($p < 0,001$), constatação concordante com os dados por nós encontrados³¹.

Zeng e colaboradores ampliaram ainda mais as análises sobre a relação da TH, mutação BRAF^{V600E} e CPT, analisando aspectos de agressividade da neoplasia. Segundo este estudo, os casos de CPT+TH+BRAF^{V600E} possuíam menos características agressivas (extensão extratireoidiana e metástase linfonodal) quando comparadas aos casos de CPT+BRAF^{V600E} sem TH³¹. Marotta e colaboradores, que também analisaram a relação entre essas 3 condições, tiveram resultados concordantes, inferindo que a tireoidite linfocítica era fator de bom prognóstico para o CPT, mesmo na presença da mutação BRAF^{V600E}, fator de mau prognóstico isolado²². As conclusões desses estudos fortalecem a ideia proposta nestes e em outras publicações de que o microambiente inflamatório formado pela reação autoimune atua como resistência ao desenvolvimento tumoral^{22,31}. Sendo assim, a TH se configura fator protetor contra a mutação e contra a evolução da doença nos casos BRAF^{V600E} positivos³¹.

Vale lembrar que, tendo em vista que este se trata de um estudo de associação, conseguimos inferir apenas a relação entre a mutação em questão e as patologias estudadas, não sendo possível, porém, concluir sobre as causas dessa relação. Temos o entendimento de que a TH se comporta de forma a reduzir a incidência da mutação BRAF^{V600E}, contudo, o mecanismo através do qual isso ocorre, seja direta ou indiretamente, ainda não está elucidado e mais estudos ainda são necessários nesse sentido.

3. Considerações sobre o estudo

Materiais fixados vem sendo utilizados para estudos diagnósticos e de biologia molecular⁴⁷. O uso desse tipo de tecido é um importante recurso para a realização de estudos de cunho retrospectivo, uma vez que permitem a análise de materiais biológicos conservados, não atuais, possivelmente de muitos anos de armazenamento^{48,49}. Atualmente, tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina são fontes importantes de materiais para produção científica, contudo, esse método pode interferir nos resultados encontrados, uma vez que essa fixação pode comprometer a integridade de macromoléculas do tecido⁴⁸.

Os fixadores objetivam manter a estrutura dos tecidos, das células e organelas, e, para isso, atuam inibindo enzimas proteolíticas que desencadeariam o processo de autólise. De forma geral, porém, os fixadores não foram desenvolvidos para manter a integridade das macromoléculas e do material genético, podendo, então, causar alterações nesses componentes^{47,48}. A formalina é o agente fixador mais utilizado mundialmente, contudo, sabe-se que essa substância pode interferir na realização de PCR pós-fixação, e especula-se que possua também efeito mutagênico^{47,49,50}. A formalina promove a formação de ligação cruzadas entre ácidos nucleicos e proteínas, reversíveis ou não, que dificultam a realização de PCR ao interferirem no processo de ligação de primers e amplificação da cadeia⁵⁰. Além disso, outras características do próprio processamento histológico do tecido e emblocamento em parafina, como tempo, temperatura, pH e armazenamento pós-fixação, também afetam a estrutura do DNA das células^{47,48,49}.

O estudo em questão foi realizado baseado na análise molecular de material extraído de blocos de parafina e, como relatado na metodologia, houve perda de grande quantidade de pacientes, 68,1% (92/135), devido à inadequação de tais amostras de DNA, que não apresentavam amplificação do éxon 15 do gene BRAF. O fato de que reextrações com *kits* específicos para tecidos parafinados tenham sido realizadas e que as concentrações de DNA e pureza tenham sido adequadas, reforçam a ideia de que esse material foi comprometido pelo processo de conservação e processamento, e que as etapas de extração e amplificação (que foi padronizada no estudo) não justificam a má qualidade do material.

Diante desse contexto, para a utilização de material parafinado com finalidade científica de longo prazo, se torna importante que o processamento histológico se dê de forma cuidadosa e seguindo os princípios de menor potencial lesivo ao RNA e DNA. O SAPC/HSR começou a empregar técnicas padronizadas e mais criteriosas com esse intuito somente no ano de 2012 justificando a má qualidade do DNA obtido em muitos dos casos.

Cabe ainda a consideração de que, por ser este um estudo de corte transversal e, portanto, não nos permitir análises temporais, o presente trabalho se restringe a conclusões que estabeleçam relações de associação. Sendo assim, estudos mais aprofundados e com desenhos longitudinais se fazem necessários para a elucidação de possíveis relações de causalidade ou proteção.

VII. CONCLUSÕES

1. A presença da mutação BRAF^{V600E} em pacientes diagnosticados com CPT é comum, e a prevalência dessa mutação em amostras tumorais analisadas de pacientes com CPT diagnosticados e tratados no Hospital São Rafael, Salvador-Bahia, foi de 65,1%.

2. O diagnóstico de TH associado a CPT acontece em número relevante de casos, sendo que a prevalência dessa associação de patologias em amostras tumorais de pacientes por nós estudados foi de 39,4%.

3. A presença de Tireoidite de Hashimoto coexistente com o CPT foi negativa, significativa e independentemente associada à presença da mutação BRAF^{V600E} em CPT.

4. Estudos que busquem elucidar e justificar as causas patogénicas dessa relação e que aprofundem a ideia de TH como fator de bom prognóstico, ou mesmo como fator protetor, são ainda necessários.

VIII. SUMMARY

TITLE: BRAF^{V600E} MUTATION TRACKING IN PAPILLARY THYROID CANCER ASSOCIATED WITH HASHIMOTO'S THYROIDITIS

Background: The BRAF^{V600E} mutation is the most prevalent mutation in patients diagnosed with papillary thyroid cancer (PTC). The clinical meaning of Hashimoto's thyroiditis (HT) associated with PTC has been studied, and so its association with BRAF^{V600E} mutation. **Objective:** Evaluate the prevalence of BRAF^{V600E} mutation in PTC associated with HT and its association with clinical and pathological features. **Methods:** Retrospective study of unicentric transversal section with consecutive PTC on patients treated at Hospital São Rafael - Monte Tabor, Salvador, Bahia. Clinical and pathological data were gathered through analysis of electronic and physical records. Polymerase chain reaction was done in order to amplify the exon 15 of BRAF gene through DNA extracted from paraffin-embedded tumor tissue post thyroidectomy. PCR readings were done and the presence of BRAF^{V600E} mutation was confirmed through direct sequencing. **Results:** 43 patients diagnosed with PTC were studied. Among those, 17 (39,4%), were simultaneously diagnosed with HT. within the latter, 7 were confirmed carriers of the BRAF^{V600E} mutation through genetic study, and 10 (66,7%) were BRAFV600E negative. The presence of these two conditions and the BRAF^{V600E} mutation were confronted. Chi-square test provided a significant negative association ($p:0,008$). In a multivariate logistic regression analysis, this relation was independent ($p:0,024$). **Conclusions:** The coexisting presence of HT and PTC may be an independent protective factor to the BRAF^{V600E} mutation.

Key words: 1. BRAF^{V600E}; 2. Papillary thyroid cancer; 3 Hashimoto's thyroiditis.

IX. REFERÊNCIAS

1. Pellegriti G., Frasca F., Regalbutto C., Squatrito S., Vigneri R. (2013). Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*, 2013, 965212.
2. Leenhardt L., Grosclaude P., Chérié-Challine L. (2004). Increased incidence of thyroid carcinoma in france: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid*, 14(12), 1056–1060.
3. Tang K.-T., Lee C.-H. (2010). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *J Chin Med Assoc*, 73(3), 113–128.
4. Talini C., Kaminski J. H., Gama R. R. (2012). Correlação entre câncer de tireoide e tireoidite de Hashimoto - estudo retrospectivo. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*, 41(1), 12–18.
5. BRASIL. (2014). Estimativa Incidência de Câncer no Brasil (Vol. 1).
6. La Vecchia C., Malvezzi M., Bosetti C., Garavello W., Bertuccio P., Levi F., Negri E. (2015). Thyroid cancer mortality and incidence: A global overview. *Int J Cancer*, 136(9), 2187–2195.
7. Instituto Nacional do Câncer – homepage: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil - Síntese de Resultados e Comentários [acesso em 23 fev 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.as>.
8. Coeli C. M., Brito A. S., Barbosa F. S., Ribeiro M. G., Sieiro A. P. A. V., Vaisman M. (2005). Incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 49(4), 503–509.
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al., eds. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase no. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed: December 12, 2013.
10. Ward L. S. (2005). Epidemiologia do câncer da tireóide no Brasil: apontando direções na política de saúde do país. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 49(4), 474–

476.

11. Dağlar-Aday A., Toptaş B., Oztürk T., Seyhan F., Saygili N., Eronat A. P., et al. (2013). Investigation of BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma and tumor-surrounding nontumoral tissues. *DNA Cell Biol*, 32(1), 13–8.
12. Li J., Zhang S., Zheng S., Zhang D., Qiu X. (2015). The BRAF V600E mutation predicts poor survival outcome in patients with papillary thyroid carcinoma: a meta analysis. *Int J Clin Exp Med*, 8(12), 22246–22253.
13. Romero A., Cuervo-Martínez J., Osorio-Arango L., Olaya N. (2015). Histological variants and prognostic factors of papillary thyroid carcinoma at the National Cancer Institute of Colombia. *Biomedica*, 35(3), 429–436.
14. Silver C. E., Owen R. P., Rodrigo J. P., Rinaldo A., Devaney K. O., Ferlito A. (2010). Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Head Neck*, 1053-59.
15. Granados M., Estrada E., Apodaca Á. (2009). Cáncer Diferenciado de la Tiroides: Aspectos Generales. *Cancerología*, 4, 65–71.
16. Ito Y., Miyauchi A., Kihara M., Higashiyama T., Kobayashi K., Miya A. (2014). Patient age is significantly related to the progression of papillary microcarcinoma of the thyroid under observation. *Thyroid*, 24(1), 27–34.
16. Beisa A., Beisa V., Stoskus M., Ostaneviciute E., Griskevicius L., Strupas K. (2016). The value of the repeated examination of BRAF V600E mutation status in diagnostics of papillary thyroid cancer. *Endokrynol Pol*, 67(1), 35-40.
17. Campos L. A. A. F., Picado S. M., Guimarães A. V., Ribeiro D. A., Dedivitis R. A. (2012). Thyroid papillary carcinoma associated to Hashimoto's thyroiditis. *Braz J Otorhinolaryngol*, 78(6), 77–80.
18. Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W. (2007). Map kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279-3290.
19. Xing M. (2013). BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*, 28(7), 742-762.
20. Greco A., Borello M.G., Miranda C., Degl'Innocenti D., Pierotti M.A. (2009). Molecular pathology of differentiated thyroid cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 53(5), 440-453.

21. Davies H. et al. (2002). Mutation of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
22. Marotta V., Guerra A., Zatelli M. C., Uberti E. D., Di Stasi V., Faggiano A., Colao A, Vitale M. (2013). BRAF mutation positive papillary thyroid carcinoma is less advanced when Hashimoto's thyroiditis lymphocytic infiltration is present. *Clin Endocrinol*, 79(5), 733–738.
23. Szeliga D. V. M., Setian N., Passos L., Lima T. M. R., Kuperman H., Della Manna T., Damiani D., Dichtchekenian V. Tireoidite de Hashimoto na Infância e na Adolescência: Estudo Retrospectivo de 43 Casos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(2), 150-154.
24. Girardi F. M., Barra M. B., Zettler C. G. (2015). Papillary thyroid carcinoma: Does the association with Hashimoto's thyroiditis affect the clinicopathological characteristics of the disease? *Braz J of Otorhinolaryngol*, 81(3), 283–287.
25. Sgarbi J. A. & Maciel R. M. B. (2009). Patogênese das doenças tireoidianas autoimunes. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 53(1), 5-14.
26. Roberti A., Sobrinho J. A., Denardin O. V. P., Rapoport A. (2006). Concomitância da Tireoidite de Hashimoto e o Carcinoma diferenciado da tireoide. *Rev Col Bras Cir*, 33(6), 345-349.
27. Alexandre L., Freixo A., Ribeiro D. A. (2012). Thyroid papillary carcinoma associated to Hashimoto's thyroiditis, *Braz J Otorhinolaryngol*. 78(6), 77–80.
28. Huang B., Hseuh C., Chao T., Lin K., Lin J. (2011). Well-Differentiated Thyroid Carcinoma with Concomitant Hashimoto's Thyroiditis Present with Less Aggressive Clinical Stage and Low Recurrence. *Endocr Pathol*, 22, 144–149.
29. Li C., Lee K. C., Schneider E. B., Zeiger M. A. (2012). BRAF V600E mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Cancer : A Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(12), 4559–4570.
30. Silva B. V. (2012) Análise da mutação V600E do gene BRAF e detecção imunohistoquímica da proteína BRAF em carcinomas papilíferos de tireoide. 79p. il. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2012.
31. Zeng R., Jin L., Chen E., Dong S., Cai Y., Huang G., et al. (2016). Potential relationship between Hashimoto's thyroiditis and BRAF V600E mutation status

- in papillary thyroid cancer. *Head&Neck*, 38(S1), 1019–1025.
32. Kim S. K., Song K., Lim S. D., Lim Y. C., Yoo Y. B. (2009). Clinical and Pathological Features and the BRAF V600E Mutation in Patients with Papillary Thyroid Carcinoma with and without Concurrent Hashimoto Thyroiditis. *Thyroid*, 19(2), 137–141.
 33. Ito Y., Kakudo K., Hirokawa M., Fukushima M., et al (2004). Biological behavior and prognosis of familial papillary thyroid carcinoma. *Surgery*, 145(1), 100–105.
 34. Jacques J., Jacques M., Henry-amar M., Bardet S. (2007). Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol*, 38(2), 212–219.
 35. Girardi F. M., Barra M. B., Zettler C. G. (2013). Variants of papillary thyroid carcinoma: association with histopathological prognostic factors. *Braz J Otorhinolaryngol*, 79(6), 738–744.
 36. Loh K., Greenspan F. S., Gee L., Miller T. R., Yeo P. P. B. (2017). Pathological Tumor-Node-Metastasis (pTNM) Staging for Papillary and Follicular Thyroid Carcinomas : A Retrospective Analysis of 700 Patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(11), 3553–3562.
 37. Liu X., Yan K., Lin X., Zhao L., An W., Wang C. (2014). The association between BRAF V600E mutation and pathological features in PTC. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 271(11), 3041–3052.
 38. Lee J.-H., Lee E.-S., Kim Y.-S. (2007). Clinicopathologic Significance of BRAF V600E Mutation in Papillary Carcinomas of the Thyroid. *Cancer*, 110(1), 38–46.
 39. Davis A. H., Jianhua W., Tsang T. C., Harris D. T. (2007) 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*, 9(2), 170-178.
 40. Azizi G., Keller J. M., Lewis M., Piper K., Puett D., Rivenbark K. M., Malchoff C. D. (2014). Association of Hashimoto’s thyroiditis with thyroid câncer. *Endocr Relat Cancer* 21(6).
 41. Pacini F., DeGroot L. J. (2000). Thyroid Cancer. [Updated 2013 Mar 27]. In: De

- Groot L. J., Chrousos G., Dungan K., et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285559/>.
42. Fiore E., Rago T., Latrofa F., Provenzale M. A., Piaggi P., Delitala A., Scutari M., Basolo F., Coscio G, Grasso L., Pinchera A., Vitti P. (2011). Hashimoto's thyroiditis is associated with papillary thyroid carcinoma: role of TSH and of treatment with L -thyroxine. *Endocr Relat Cancer*, 18, 429–437.
 43. Rago T., Scutari M., Latrofa F., Grasso L., Pinchera A., Vitti P. (2007). Clinical features of thyroid autoimmunity are associated with thyroiditis on histology and are not predictive of malignancy in 570 patients with indeterminate nodules on cytology who had a thyroidectomy. *Clin Endocrinol*, 67(3), 363–369.
 44. Chen H., Replinger D., Bargren A., Zhang Y. W., Adler J. T., Haymart M. (2009). Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *J Surg Res*, 150(1), 49–52.
 45. Anil C., Goksel S., Gursoy A. (2010). Hashimoto's Thyroiditis Is Not Associated with Increased Risk of Thyroid Cancer in Patients with Thyroid Nodules. *Thyroid*, 20(6), 601–606.
 46. Liebert M. A., Kashima K., Yokoyama S., Noguchi S., Murakami N., Watanabe S., Nakayama I. (1998). Thyroiditis as a Favorable Prognostic Papillary Thyroid Carcinoma Factor in. *Thyroid*, 8(3), 197–202.
 47. Douglas, M. P., & Rogers, S. O. (1998). DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res*, 401(1-2), 77–88.
 48. Scorsato A. P., & Telles J. E. Q. (2011). Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol Med Lab*, 47(5), 541–548.
 49. Sengüven B., Baris E., Oygur T., Berktaş M. (2014). Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *Int J Med Sci*, 11, 494–499.
 50. Ben-Ezra J., Johnson A., Rossi J., Cook N., Wu A. (1991). Effect of Fixation on the Amplification of Nucleic Acids from Paraffin-embedded Material by the Polymerase Chain Reaction. *J Histochem and Cytochem*, 39(3), 351–354.

X. ANEXOS

Anexo I – Protocolo de revisão de 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 recorrential (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 recorrential (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 II – Parecer do CEP – Plataforma Brasil

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DA MUTAÇÃO BRAFV600E EM VARIANTES AGRESSIVAS DE CARCINOMA PAPILIFERO E CARCINOMA ANAPLÁSICO DE TIREOIDE

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 BRAFV600E em variantes agressivas de carcinoma papilífero e carcinoma anaplásico de tireóide. É financiado pela FAPESB. Propõe-se a correlacionar a presença da mutação BRAFV600E 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 transverso 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 tireóide 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 tireóide 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: GIN

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7815

CEP: 75.000-000

E-mail: opees.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 radioterapia, 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 pré-operatória, podendo influenciar na extensão da conduta cirúrgica adotada, e consequentemente 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 câncer 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 Apreciação 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

Darci de Oliveira Santa Rosa

Assinado por:
DARCI DE OLIVEIRA SANTA ROSA

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar
Bairro: SN
UF: BA Município: SALVADOR

CEP: 75.000-000

Telefone: (71)3283-7815

E-mail: conep.ufba@ufba.br

Anexo III – Aprovação da diretoria médica do HSR**APROVAÇÃO DA DIRETORIA MÉDICA**

Declaro que conheço o projeto intitulado "*Análise da mutação BRAF^{V600E} 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 Julho de 2021.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lillian Ronzoni', written over a horizontal line.

Dra. Lillian Ronzoni
Diretora Médica