

PRISCILA PEREIRA COSTA DE ARAÚJO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *BRAF* E SUAS
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS E
PROGNÓSTICAS PARA PACIENTES PORTADORES DE
CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE**

CAMPINAS – UNICAMP

2009

PRISCILA PEREIRA COSTA DE ARAÚJO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *BRAF* E SUAS
POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS E
PROGNÓSTICAS PARA PACIENTES PORTADORES DE
CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE**

*Dissertação de Tese de Mestrado apresentada à
Pós – Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica Médica*

Orientadora: Prof^a Dr^a. Laura Sterian Ward

Co – orientador: Prof. Dr. Alfio José Tincani

CAMPINAS – UNICAMP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Araújo, Priscila Pereira Costa de

Ar15a Análise da expressão do gene *BRAF* – implicações diagnósticas e prognósticas para pacientes portadores de carcinoma papilífer da tireóide / Priscila Pereira Costa de Araújo. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Laura Sterian Ward, Alfio José Tincani

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

Título em inglês : BRAF expression may help identify malignant nodules and define outcomes in papillary thyroid cancer patients

Keywords: • Thyroid
• Thyroid neoplasm
• Genetic predisposition to disease
• Carcinoma, papillary
. Prognosis

Titulação: Mestrado em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Laura Sterian Ward
Prof^º. Dr^º. Alfio José Tincani
Prof^º. Dr^º. Fabio Luiz de Menezes Montenegro

Prof^º Dr^º José Vassalo

Data da defesa: 31-08-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Priscila Pereira Costa de Araujo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward

2. Prof. Dr. Fábio Luiz de Menezes Montenegro

3. Prof. Dr. José Vassallo

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2009

DEDICATÓRIA

À minha mãe Célia, que me ensinou o poder do amor sobre todas as coisas, coisa que me foi muito útil na condução de momentos cruciais em nossas vidas;

Ao meu pai Arivaldo, que me ensinou a ter fé e nela perseverar, ainda que de modo diferente do originalmente ensinado e à luz das mudanças e evolução deste mundo;

Ao meu marido e mentor Alfio, amor da minha vida, companheiro de todas as horas e co-orientador deste trabalho, sem o qual o mesmo nunca teria a qualidade almejada.

Aos meus irmãos, Mariane e Adriano, meu tio Sérgio e minha avó Maria, que completam a minha família.

À Prof^a. Dr^a. Laura, pela (muita) paciência e experiência colocada (a meu serviço) durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laura, pelo incentivo nas horas difíceis e pela cobrança nas horas de esmorecimento, auxiliando no possível e no impossível e colaborando definitivamente para a minha evolução como médica e cientista.

Ao meu marido Alfio pela grande experiência, da qual um pouco emprestei para a confecção desta tese.

À estatística Sirlei Moraes pelo enorme trabalho que teve em gerar dados confiáveis.

Ao graduando Stefano Tincani (aluno de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo) pelo enorme auxílio na confecção das referências para esta tese.

À bióloga Elaine Morari pelas palavras de conforto e auxílio técnico na hora em que mais experiência se fazia necessária.

Às biólogas Ana Carolina Guilhen e Marjory Marcello pelo trabalho empregado na confecção desta tese.

Às muitas pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram até a chegada neste momento crucial em minha vida.

E finalmente aos inúmeros pacientes que, com esperança e confiança em nosso trabalho, concordaram em ceder um pouco de si mesmos para a evolução da ciência numa hora de decisões tão difíceis.

**“Limites? Não conheço nenhum. Mas ouvi dizer que eles existem na
cabeça de algumas pessoas”**

*(Boundaries? I have seen no one. But I have heard that they might exist in
some people's minds)*

(Thor Heyerdahl, “o último Viking”, 1914 – 2002)

SUMÁRIO

RESUMO _____xiv

ABSTRACT _____xvii

LISTA DE ABREVIATURAS _____xix

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS _____xxi

I. INTRODUÇÃO _____1

I.1. Epidemiologia e aspectos gerais do câncer de tireóide _____2

I.2. Fatores Prognósticos e Sistemas de Estadiamento _____3

**I.3. Marcadores Moleculares em Carcinoma Papilífero e sua Importância
Prognóstica** _____6

I.4. Vias de sinalização _____7

I.5. A via das MAP quinases (*MAPK*) _____8

I.6 A família *RAF* _____11

I.7. O gene *BRAF* _____12

II. OBJETIVOS _____17

III. CASUÍSTICA	19
III.1. População de estudo	20
III.2. Critérios de inclusão	20
III.3. Critérios de exclusão para os tumores malignos	21
III.4. Critérios de exclusão para os nódulos benignos	21
III.5. Da população de 32 pacientes portadores de carcinoma papilífero	32
III.5.1. Sexo	18
III.5.2. Idade	19
III.5.3. Estádio Clínico	19
III.6. Das características dos 32 tumores malignos	19
III.6.1. Tamanho das lesões	19
III.6.2. Critérios ultrassonográficos	19
III.6.3. Características de agressividade anátomo-patológica	23
III.6.4. Valores de expressão de mRNA de <i>BRAF</i>	23
III.6.5. Ocorrência da mutação <i>V600E</i>	23
III.7. Das Lesões Benignas	23

III.8. Cirurgia e Seguimento dos 67 Doentes (casos malignos e benignos)	24
III.8.1. Cirurgia	24
III.8.2. Seguimento clínico dos pacientes	21
IV. MÉTODOS	27
IV.1. Análise da Expressão de mRNA de <i>BRAF</i>	27
IV.2. Verificação da mutação <i>hot spot</i> de <i>BRAF</i>	30
V. RESULTADOS	33
V.1. Dados diagnósticos obtidos pela expressão de mRNA <i>BRAF</i>	34
V.2. Dados prognósticos e a expressão de mRNA <i>BRAF</i>	37
V.3. Estudo da Mutação convencional	38
V.4. Sobre o poder de estudo e FPRP	33
V.5. Análise Estatística	39
VI. DISCUSSÃO	41
VI.1. Generalidades	42
VI.2. Contribuição do trabalho atual	43
VI.3. A expressão do gene <i>BRAF</i> e outros marcadores	45
VII. CONCLUSÃO	51

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina mais comum em humanos, correspondendo a cerca de 1% de todos os tumores malignos. A presença de nódulos em tireóide é bastante comum, principalmente em mulheres acima dos 60 anos. O gene *BRAF* está sabidamente implicado na origem dos carcinomas da variante papilífera. Sua mutação *BRAFV600E* tem sido frequentemente relacionada ao grau de agressividade do tumor e ao prognóstico dos pacientes. Apesar do papel da expressão deste gene ser bem estabelecida como um importante iniciador da via de sinalização *MAP* quinase, sua relação a suscetibilidade ao câncer e o prognóstico clínico dos doentes é ainda pouco compreendida. O objetivo deste trabalho foi mensurar a expressão do gene *BRAF* numa determinada população portadora de nódulos de tireóide, de modo a correlacionar estes achados com o prognóstico clínico ao seguimento, bem como verificar retrospectivamente as implicações diagnósticas de sua ocorrência.

MATERIAL/MÉTODOS: Foram determinados os níveis de expressão relativa do tipo selvagem de *BRAF* e da mutação *hot spot BRAFV600E* através de tecidos coletados a fresco, utilizando-se a técnica de PCR quantitativa em tempo real (*qRT-PCR*) e PCR convencional com a utilização de enzimas de restrição (*cDNA – PCR-RFLP - restriction fragment length polymorphism*) em uma população inicial de 166

pacientes portadores de nódulos de tireóide, dos quais foram selecionados para estudo 32 portadores de carcinomas papilíferos e 35 com nódulos benignos, todos submetidos a tireoidectomia total e seguidos por até 56 meses (média de $21,3 \pm 12,45$ meses). Neste material foram feitas comparações entre os parâmetros clínicos e referentes ao tumor já bem estabelecidos para o carcinoma bem diferenciado de tireóide.

RESULTADOS: Dos 32 pacientes portadores de carcinomas papilíferos, 28 (87,5%) eram do sexo feminino e um paciente apresentou recorrência local (3,1%). A mutação de *BRAF* foi identificada em nove pacientes (28,1%). Dos 35 pacientes portadores de nódulos benignos, sete (20%) eram portadores de adenomas foliculares e 28 (80%) correspondiam a bócios atóxicos multinodulares. Vinte e sete pacientes (77,1%) eram do sexo feminino. Estes 35 pacientes tiveram sua expressão de *BRAF* mensurada de modo a realizar estudo comparativo. A expressão de *BRAF* distinguiu entre nódulos benignos e malignos com uma sensibilidade de 80,6%, especificidade de 77,1% e acurácia de 78,8%. Verificou-se um risco para malignidade aumentado em 14 vezes quando a expressão de *BRAF* era acima do ponto de corte de 4,7 unidades arbitrárias (UA). Não houve correlação significativa entre a expressão de *BRAF* (excluídos os casos portadores da mutação) e sobrevida ($r=0,54$; $p=0,007$).

CONCLUSÃO: Conclui-se que a quantificação da expressão de *BRAF* pode ser útil no diagnóstico de nódulos malignos. Nódulos com expressão de *BRAF* acima do ponto de corte (4,712 UA) apresentam 14 vezes mais risco para malignidade. Não houve correlação significativa entre a expressão de *BRAF* e sobrevida na amostra estudada.

PALAVRAS CHAVE: Tireóide – Câncer de Tireóide – Predisposição Genética para Doenças – Carcinoma Papilar - Prognóstico

ABSTRACT

BACKGROUND: Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, corresponding to 1% of all human neoplasms. Thyroid nodules are very frequent, mainly in women over 60 years. The relationship of *BRAF* gene with papillary thyroid tumorigenesis is well recognized in the literature. Its *BRAFV600E* mutation has been related to tumor aggressiveness and patients' prognosis. Despite the role of *BRAF* gene expression as an important *MAPK* pathway promoter, its relationship to patients' cancer susceptibility and clinical outcome is still poorly understood. The objective of this thesis was to measure mRNA *BRAF* expression in a determined population harboring thyroid nodules, in order to correlate these findings with prognosis at follow up, as well as to verify retrospectively the clinical importance of its occurrence.

MATERIAL/METHODS: We determined the relative expression levels of wildtype *BRAF* and *BRAFV600E* mRNA obtained from fresh tissue samples collected by quantitative PCR (*qRT-PCR*) and *cDNA—PCR-RFLP* (*restriction fragment length polymorphism*) in a population of 166 thyroid nodule patients, in which 32 papillary thyroid cancer patients were selected for study as well as 35 patients harboring benign nodules, all submitted to total thyroidectomy and followed

up to 56 months (21,3±12,45 months on average). Comparisons were made to well-recognized determinants in differentiated thyroid cancer.

RESULTS: Twenty-eight (87.5%) of 32 papillary thyroid carcinoma patients were female and one presented local recurrence at follow up (3,1%). *BRAF hot spot* mutation was identified in nine patients (28,1%). Of the 35 patients harboring benign nodules, seven (20%) comprehended follicular adenomas and 28 (80%) were multinodular goiters. Twenty-seven patients (77,1%) were female. These 35 patients had *BRAF* expression measured in order to perform a comparative study, in which *BRAF* expression distinguished benign and malignant nodules with a sensitivity of 80.6%, specificity of 77.1% and an accuracy of 78.8%. A 14-times increased risk for malignancy was observed when *BRAF* expression was above the cut-off point of 4,712 arbitrary units (AU). There was not a significant correlation among *BRAF* expression (when mutation was excluded) and survival ($r=0,54$; $p=0,007$).

CONCLUSION: We concluded that the quantification of *BRAF* expression may be useful for diagnosing malignant nodules. Nodules with *BRAF* expression higher than the cut-off point of 4,712 UA harbored a 14-times increased risk for malignancy. There was not a significant correlation among *BRAF* expression and survival at this sample.

KEYWORDS: Thyroid - Thyroid neoplasm - Genetic predisposition to disease - Papillary Carcinoma - Prognosis

LISTA DE ABREVIATURAS

AKAP9 – *A-kinase anchor protein (quinase de ancoragem de proteínas)*

ATP – *adenosina trifosfato*

BRAF - *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, ou B-type Raf kinase (oncogene do vírus do sarcoma murino homólogo B1 ou Raf – quinase tipo B)*

°C – *graus Celsius*

cDNA – RFLP - *restriction fragment length polymorphism (polimorfismo por fragmentos de restrição)*

CDT – *carcinoma bem diferenciado de tireóide*

CP - *carcinoma papilífero*

cm – *centímetros*

DNA – *desoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)*

EC - *esvaziamento cervical*

ERK - *extracellular signal regulated kinase (quinase regulada por sinal extracelular)*

FPRP – *false positive report probability (probabilidade reportada de falsos positivos)*

MAPK - *mitogen activated protein kinases (quinase ativada por mitógenos)*

MEK – *corruptela das siglas MAPK e ERK, referindo-se ao seu efetor final (MAPK + ERK)*

NATH – *gene da família N – acetyl-transferase*

NCI – *National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer – EUA)*

NIS – *sodium iodide symporter (transportador sódio-iodo)*

PAAF - *punção aspirativa por agulha fina*

PAX8/PPARgamma – *translocação envolvendo os genes paired box gene 8 e peroxisome proliferator-activated*

PCI – *pesquisa de corpo inteiro*

qRT-PCR – *quantitative Real Time PCR (polimerase chain reaction)- reação de PCR em tempo real quantitativa*

RAF – *família de oncogenes derivados de pesquisas com células de ratos transduzidas por retrovírus*

RAS – **Rat Sarcoma** (família de oncogenes primeiro identificada nos sarcomas murinos de Harvey (vírus do sarcoma do rato)).

RET – **Rearranged during Transfection**(rearranjado durante transfecção)

RET/PTC – *rearranjo derivado de uma translocação ativadora do gene RET no carcinoma papilífero da tireóide (em inglês, papillary thyroid carcinoma, PTC)*

RNA – *ribonucleic acid (ácido ribonucleico)*

SNP – *single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)*

TNM – *tumor-node-metastasis staging system*

TP - *tireoidectomia parcial*

TSH – *thyroid stimulating hormone (hormônio estimulador da tireóide)*

TT = *tireoidectomia total*

UA – *unidades arbitrárias*

VFCP - *variante folicular do carcinoma papilífero*

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Estadiamento dos tumores de tireóide segundo a American Joint Comitee of Cancer AJCC), 6^a. Edição, 2002, onde T = tumor, N = linfonodos regionais acometidos e M = metástases à distância _____ 5

Figura 1: Via de sinalização de tirosino-quinase, mostrando a participação de *BRAF* na cascata *RAS-RAF-MAPK* _____ 11

Figura 2. Distribuição dos 67 pacientes da casuística demonstrando a classificação à punção aspirativa por agulha fina, os diagnósticos histológicos e a amostragem final considerada para estudo _____ 26

Gráfico 1. Resultado visual final de um ciclo completo de PCR em tempo real (*qRT-PCR*) para um determinado grupo de amostras. Notar a intensa diferença entre a amplitude das duas curvas sigmóides, revelando a grande diferença entre a expressão da amostra estudada (direita) e do controle interno (esquerda) _____ 29

Gráfico 2. Exemplo de distribuição gráfica dos resultados de uma placa com amostragem de oito pacientes e resultado visual dos dados referentes à expressão de *BRAF* em relação ao controle negativo (NTC, à direita) e ao calibrador (CM 118N, à esquerda), gerada pelo programa *Primer Express* após ciclo de *qRT-PCR* _____ 30

Figura 3. Gel em agarose a 2% com coloração por brometo de etídio, demonstrando a mutação *V600E* de *BRAF* em amostra de tecido de carcinoma papilífero de tireóide (fragmento de 224 pb) _____ 31

Tabela 3. Valores absolutos para a expressão de mRNA BRAF nos tumores malignos e benignos, demonstrando os limites mínimos e máximos de expressão e a significância estatística desta diferença _____34

Gráfico 3. Diferença entre o maior pico de expressão de *BRAF* para nódulos benignos (azul) e malignos (vermelho) da amostragem estudada _____35

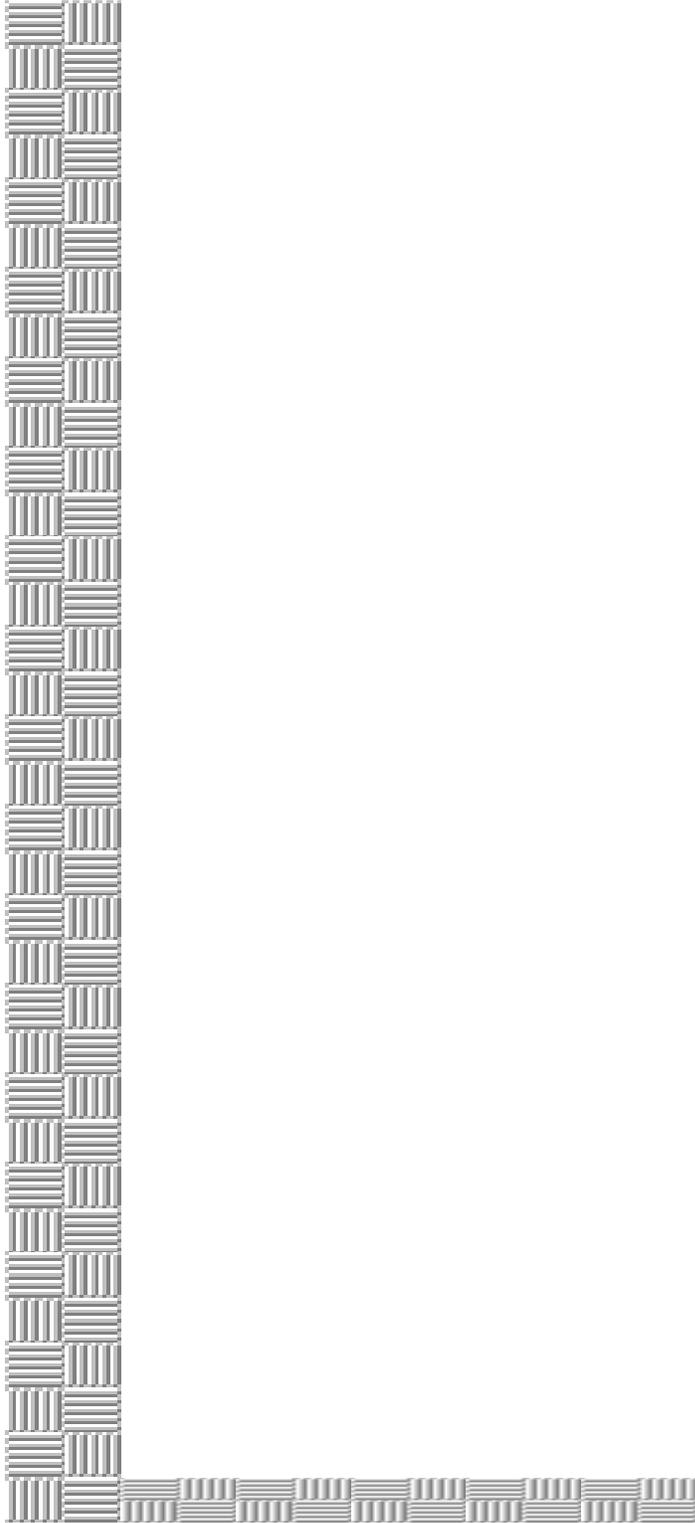
Gráfico 4. Distribuição dos 67 casos estudados pela curva ROC para a expressão de mRNA *BRAF* para diferenciação de nódulos benignos e malignos utilizando-se o valor de ponto de corte 4,712 _____36

Tabela 4. Sensibilidade, especificidade e valores preditivos para os pacientes portadores de carcinoma papilífero x nódulos benignos da amostra estudada, considerando-se o ponto de corte identificado _____36

Tabela 5. *Odds ratio* calculado para a expressão de mRNA de *BRAF* entre os pacientes portadores de nódulos benignos e malignos, representando o risco relativo para malignidade para a expressão acima do ponto de corte _____37

Tabela 6. Distribuição dos 26 pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide demonstrando o índice de correlação de Spearman entre expressão e sobrevida. Foram excluídos os pacientes portadores da mutação *V600E* _____38

Tabela 7. Probabilidade de evento, poder do estudo e valor do FPRP para os 32 casos com expressão de *BRAF* determinada por *qRT-PCR* _____39



I. Introdução

I. INTRODUÇÃO

I.1. EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER DE TIREÓIDE

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina mais comum em humanos, correspondendo a cerca de 1% de todos os tumores malignos ^(1, 2). Os tipos mais comuns são os carcinomas diferenciados de tireóide (CDT), representados pelas neoplasias papilíferas, foliculares e seus subtipos, sendo as demais correspondentes aos carcinomas medulares e anaplásicos além de outros tipos mais raros ⁽³⁾. Nos Estados Unidos da América estimou-se cerca de 37000 novos casos e 1500 óbitos pela doença no ano de 2008 sendo a incidência de 4,6/100000 homens e 13,4/100000 mulheres ⁽⁴⁾, com mortalidade de 0,5/100000 homens/mulheres, evidenciando a importância do estudo desta patologia no contexto das neoplasias endócrinas. No Brasil esta incidência é bastante variável, revelando a grande discrepância decorrente da vastidão geográfica de nosso território, da diferença de qualidade no registro dos dados e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde ⁽⁵⁾. Porém, estes números são possivelmente subestimados, em virtude da ocorrência em maior frequência de outros tipos de neoplasias consideradas de maior relevância sócioeconômica e também pela falta de políticas adequadas de saúde pública ⁽⁶⁾.

O carcinoma papilífero e seus subtipos representam cerca de 80% das neoplasias da glândula tireóide ^(7, 8). Apresentam caráter geralmente indolente e

várias características e curso clínico peculiares, bem como fatores de risco bem estabelecidos. Sabe-se que o diagnóstico de CDT é mais frequente em mulheres, pontuando um possível papel de genes e/ou hormônios sexuais em sua origem. Algumas características clínicas parecem influenciar sua existência. A presença de nódulos prévios, bem como bóciolos de longa data não tratados, parecem igualmente contribuir para a ocorrência de neoplasias ⁽⁹⁻¹¹⁾. Já a o tabagismo tem implicação controversa, sendo bem conhecida a relação direta entre o hábito de fumar e um aumento da incidência de doença autoimune e oftalmopatia de Graves ⁽¹²⁻¹⁴⁾, porém parecendo este hábito não ser um fator de risco para câncer; a ativação de sistemas de defesa tipo fase II (citocromo P450) ⁽¹⁵⁾ neste caso parece conferir papel protetor.

Influências do ambiente, comportando desde hábitos do paciente (como tipo de dieta e o próprio tabagismo, já mencionado), até exposição ocupacional e repetida a agentes químicos, raios ultravioleta e radiação ionizante, entre outros, podem implicar na ocorrência de tumores tireoidianos ⁽¹⁶⁾.

1.2. FATORES PROGNÓSTICOS E SISTEMAS DE ESTADIAMENTO

O carcinoma papilífero apresenta o melhor prognóstico dentre todos os subtipos de neoplasias malignas da tireóide, com sobrevida global em 20 anos que pode chegar a 98% ⁽¹⁷⁾. São pacientes, portanto, que demandam longo tempo de seguimento e necessitam acompanhamento individualizado dada sua apresentação heterogênea, uma vez que há um grupo seletivo de pacientes que pode apresentar

riscos elevados para recidiva e/ou óbito pela doença. No intuito de se individualizar o tratamento e o seguimento destes pacientes, nos últimos 30 anos foram realizadas classificações em grupos de baixo, intermediário e alto risco, baseadas nas características clínicas e anátomo-patológicas de cada caso, numa tentativa de estratificação que levasse a um melhor conhecimento do comportamento da doença em cada grupo de modo a otimizar o tratamento para estes doentes ⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Porém, notamos que, com frequência, estas tentativas de estratificação não correspondem à realidade clínica, uma vez que com a maior observação destes casos temos pacientes que, mesmo apresentando tumores iniciais, apresentam má evolução e vice-versa, sugerindo outros possíveis fatores que implicam este tipo de neoplasia.

Fez-se então necessária, à luz dos conhecimentos atuais, principalmente em biologia molecular, uma minuciosa e pormenorizada re-classificação destes pacientes com maior fator de risco. Com o advento das técnicas mais modernas de laboratório e o desenvolvimento de testes rápidos e precisos, houve grande impulso nos últimos dez anos nesta direção, inaugurando assim uma nova era da cancerologia em que os pacientes passaram a ter sua evolução clínica comparada aos estudos moleculares sobre sua doença, agregando assim saber específico, com potencial para tratamento individualizado dentro das chamadas terapias-alvo, cujo objetivo final é a maior especificidade com menor efeito colateral possível ⁽²¹⁻²⁴⁾.

Os fatores de risco mais conhecidos podem estar relacionados ao paciente, à neoplasia ou ambos. Os primeiros correspondem à idade e sexo. Em relação ao tumor, há uma série de aspectos histopatológicos, sendo estas as variantes dentro de um mesmo tipo histológico, tamanho, grau de diferenciação, extensão extratireoidiana, multifocalidade, comprometimento metastático além de outros aspectos não tão significativos ⁽²⁵⁾. O sistema de estadiamento prognóstico mais utilizado até os dias atuais para os carcinomas bem diferenciados da tireóide ainda é o sistema TNM ⁽²⁶⁾, como demonstra a tabela a seguir.

ESTADIAMENTO AJCC 2002		
Estádio	< 45 anos	> 45 anos
I	M0	T1
II	M1	T2-3
III	—	T4 / N1
IV	—	M1

AJCC, 2002

Tabela 1. Estadiamento dos carcinomas bem diferenciados de tireóide segundo a American Joint Comitee of Cancer, AJCC), 6ª. Edição, 2002, em que T = tumor, N = linfonodos regionais acometidos e M = metástases à distância

Porém, este sistema comporta muitas deficiências e não considera os conhecimentos atuais em biologia molecular, os quais podem trazer tanto

elucidações diagnósticas quanto elaborar perfis mais individualizados de risco prognóstico, uma vez que partem da premissa de alterações que são individuais e personificadas para cada indivíduo, e não no âmbito do conjunto de uma população, apenas.

1.3. MARCADORES MOLECULARES EM CARCINOMA PAPILÍFERO DE TIREÓIDE E SUA IMPORTÂNCIA PROGNÓSTICA

Marcador molecular pode ser definido como qualquer molécula que possua uma sequência de DNA capaz de identificar um organismo, espécie, ou traço fenotípico a este associado. São características de DNA herdadas geneticamente e que diferenciam dois ou mais indivíduos. A sensibilidade e a especificidade de cada marcador dependem de sua capacidade de evidenciar o processo celular ao qual está relacionado. Este deve ser facilmente reprodutível por técnicas de laboratório padronizadas e demonstrar inequivocamente aspectos do ciclo celular relacionados a uma função específica como apoptose, crescimento, diferenciação e proliferação.

Os cânceres da glândula tireóide apresentam alterações genéticas altamente prevalentes, algumas inclusive observadas apenas nestes tumores ⁽⁸⁾. Estas alterações oncogênicas já bem descritas, ditas clássicas e em sua maioria somáticas, incluem mutações nos genes *RAS* ^(27, 28) e *BRAF* ⁽²⁹⁾. No gene *RET* esta é

muitas vezes germinativa e implicada na gênese do carcinoma medular da tireóide na forma de mutações pontuais ^(30, 31) ou, de modo somático, assumindo a forma de rearranjos - as translocações *RET/PTC*, vigentes para o carcinoma papilífero ⁽³¹⁻³³⁾. Estas alterações tão características foram os primeiros marcadores moleculares identificados em tireóide, descobertas no ínterim do desenvolvimento de técnicas de laboratório para o rastreamento de neoplasias em larga escala e partilham algumas características únicas que facilitam o estudo da correlação de sua ocorrência com o câncer, como o fato de serem as três sempre mutuamente excludentes.

1.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO

Vias de sinalização são interações moleculares que permitem a comunicação intercélulas através da membrana celular. Com a descoberta do DNA e o entendimento dos mecanismos de transmissão intercelular observou-se a ocorrência de certos fenômenos moleculares em cascata, a partir de um gatilho variável, para um receptor transmembrana, desencadeando reações que ativam organelas no meio intracelular, culminando em uma via efetora final que gera a função almejada, como crescimento, proliferação e adesão. Estas podem servir a múltiplas finalidades e podem ser contrarreguladas a qualquer momento do ciclo por suas interações, tendo principalmente como funções básicas o crescimento, a

proliferação e a morte celular programada, constituindo assim o chamado ciclo vital celular ⁽³⁴⁾.

Seguindo esta lógica, uma ativação anormal nestas vias de sinalização poderia, portanto, levar ao aparecimento de neoplasias. Isto ocorreria por mecanismos desestabilizadores da cascata efetora, tanto por lesão direta na estrutura do DNA quanto por fenômenos epigenéticos, que são alterações na expressão de um fenótipo final sem alterações na sequência do DNA de origem, levando a mudanças no efeito final esperado. Um exemplo característico deste fenômeno é a metilação aberrante da via *MAPK*, que parece ser a base da perda de avidéz por iodo encontrada no seguimento de alguns pacientes com mau prognóstico em CDT. Este mecanismo silencia alguns genes tireoespecíficos envolvidos no metabolismo das iodinases, incluindo o gene *NIS* ⁽³⁵⁾ e o gene receptor de TSH ⁽³⁶⁾.

I. 5. A VIA DAS MAP QUINASES (MAPK/ERK/MEK)

A via de sinalização *MAP* quinase tem sido bastante estudada na última década principalmente em relação à ativação por *RAS*, cujas alterações têm sido associadas a quase todos os tipos de câncer. É uma via reguladora do ciclo celular, fundamental para a síntese de DNA, diferenciação celular e estabilidade cromossômica ⁽³⁷⁾.

As quinases (ou fosfotransferases) são enzimas que transferem grupamentos fosfato de moléculas doadoras de alta energia a moléculas-alvo específicas, catalisando assim a conversão de proenzimas em enzimas ativas, num processo denominado fosforilação ⁽³⁸⁾. A via das *MAP* quinases estimula a proliferação celular, representando uma via-chave no desenvolvimento, uma vez que media inúmeras funções como crescimento, transformação e apoptose ⁽³⁹⁾.

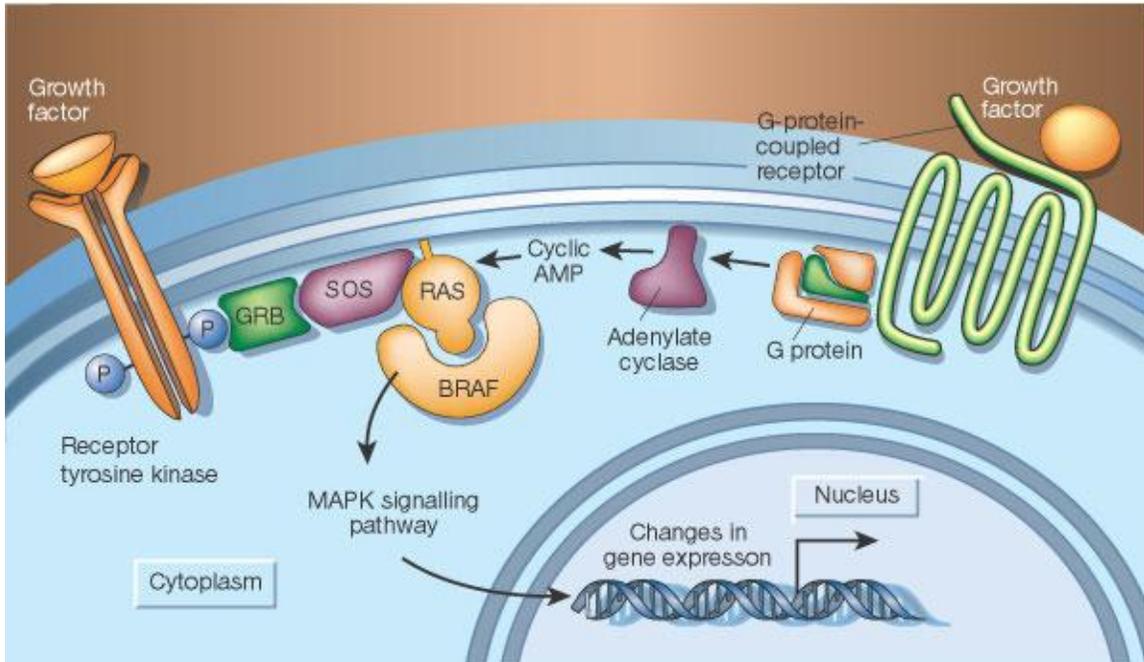
Um dos componentes essenciais desta via é a família *RAF*, composta por serinotreonino quinases, que enviam um sinal extracelular para o complexo transmembrana receptor/*RAS*, ativando assim uma cascata citoplasmática que, quando triplamente fosforilada e agora denominada *MAP3K*, irá ativar outra quinase denominada *ERK*, que por sua vez fosforila proteínas citossólicas e nucleares (*MAP3K/ERK = MEK*), de modo a liberar nova reação em cascata que culmina no crescimento e/ou proliferação celular. A ativação desta via é um comum e importante mecanismo de geração e progressão de tumores em humanos através de superestimulação deste processo (Figura 1).

A regulação tanto de *RAS* quanto de *RAF* é crucial à manutenção do crescimento celular e as transformações nestes genes levam a atividade mutagênica. O gene *RAS* apresenta mutação em cerca de 30% de todos os tumores em humanos e a mutação de *BRAF* está presente em 60% dos melanomas. Estes mecanismos regulatórios já são bem compreendidos. Contudo, a regulação de *RAF* é complexa e envolve a integração de outras vias de sinalização bem como reações moleculares de

fosforilação, defosforilação e interações interprotéicas (proteína-proteína). A partir dos estudos com isoformas de *RAF* em mamíferos, padrões individuais e diferenças únicas surgiram.

A maioria das alterações genéticas em câncer da tireóide exercem seu efeito oncogênico, ao menos parcialmente, através da ativação desta via, que é importante mecanismo de gênese e progressão de neoplasias em humanos, o que ocorre através de promoção da divisão e proliferação celular levando, portanto, à gênese de tumores quando a mesma está ativada ^(40, 41).

Figura 1: Via de sinalização de tirosino-quinase, mostrando a participação de *BRAF* na cascata *RAS-RAF-MAPK*. Retirado de Pollock PM, Meltzer PS. A genome-based strategy uncovers frequent *BRAF* mutations in melanoma. *Cancer Cell*. 2002 Jul;2(1):5-7⁽⁴²⁾.



1.6. A FAMÍLIA *RAF*

Três isoformas para a família *RAF* foram descritas em células de mamíferos: *A-RAF*, *B-RAF* e *C-RAF* ou *RAF-1*, sendo *BRAF* a isoforma mais expressa em tecidos hematopoéticos, testículos e células neuronais, bem como a forma mais prevalente nas células tireoidianas foliculares⁽⁴³⁾.

Esta família de proto-oncogenes codifica sinais de tradução que primeiramente foram identificados em sua forma ativada, como oncogenes propriamente ditos ⁽⁴⁴⁾. A partir de então, o estudo da gênese de tumores em tireóide baseada na via de ativação *MAPK* levou à conclusão de que existem alterações mutuamente excludentes participando da origem das neoplasias, mas que apesar disto podem ser cumulativas ao longo da evolução do indivíduo ⁽⁴⁵⁾. Isto vale para interações tanto entre oncogenes classicamente, como *RAS* e *RAF*, quanto para a própria interação entre membros da família *RAF*. Porém, mesmo com a expressão das outras isoformas (*ARAF* e *CRAF*), estas parecem não ter participação patogênica no carcinoma papilífero de tireóide.

1.7. O GENE BRAF

O potencial oncogênico de *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) foi descoberto durante estudo com cultura de células para o sarcoma de Ewing por Rapp em 1983 ⁽⁴⁶⁾. Notou-se então que, em clones de cDNA que foram isolados, uma substituição na porção amino-terminal da proteína *RAF*, quando ativada por uma transversão tiamina – adenina no nucleotídeo 1796 original, gerava uma troca de aminoácido valina por ácido glutâmico, o que conferia atividade mutagênica a um gene que era estruturalmente relacionado porém distinto de *CRAF* e *ARAF* já previamente conhecidos, sendo assim chamado *BRAF*.

Esta isoforma exibe a estrutura bilobar característica do grupo das proteínó-quinases que, em sua conformação inativa, forma resíduos hidrofóbicos nos domínios 596 a 600 no sítio de ligação com ATP, resultando numa estrutura não propensa à interação com este ou outros substratos. Mutações oncogênicas nesta alça de ativação ou no sítio de ligação com o ATP rompem esta interação hidrofóbica e desestabilizam a conformação inativa. A troca de uma timidina por uma adenina na posição 1799 deste proto-oncogene (*T1799A*) é a mutação de ponto mais conhecida com efeito desestabilizador em *BRAF*.

A descoberta de mutações ativadoras para este gene foram otimizadas com o desenvolvimento de ensaios para alterações genéticas sabidamente ativadoras da via *MAP* quinase, o que acabou reiterando a importância da mesma na gênese de vários cânceres em humanos ⁽⁴⁷⁾. Este gene possui ainda sete polimorfismos pontuais de nucleotídeo que são denominados *SNPs* descritos para regiões intrônicas ou promotoras, responsáveis por diferentes haplótipos que foram inicialmente relacionados ao risco de desenvolvimento de melanoma ⁽⁴⁸⁾. As mutações do gene *BRAF* também vêm sendo correlacionadas com tipos histológicos mais agressivos de carcinoma diferenciado em tireóide, de forma que é possível que os haplótipos em questão também se correlacionem com o prognóstico dos pacientes.

Das três isoformas, *BRAF* está localizada no braço longo do cromossomo 7, e é o mais potente ativador da via *MAPK* ^(49, 50). Uma mutação pontual denominada *missense*, que ocorre quando a troca de aminoácido gerada altera o significado

funcional da proteína final, foi identificada nos exons 11 e 15 do gene, sendo que a troca correspondente *T1799A* responde por mais de 80% das mutações em *BRAF* ⁽⁵¹⁾. Esta mutação, anteriormente chamada *T1796A*, era baseada na sequência NM 004333 da base de dados do National Cancer Institute (NCI) denominada *Gen Bank*, a qual carecia de um códon do exon 1 do gene *BRAF*. Com a correção da versão e a vigência da sequência NT 007914 já disponível, a mutação é hoje designada *T1799A* e passou a ser considerada *V600E* e não mais *V599E* ⁽⁵²⁾.

Esta mutação mimetiza a fosforilação do seguimento de ativação de *BRAF* pela inserção de um resíduo de carga elétrica negativa adjacente ao sítio de fosforilação ⁽⁴⁷⁾. Isto leva à conversão de *BRAF* a uma forma cataliticamente ativa, pela disruptura do seguimento de ativação na alça de ligação com o ATP, que normalmente mantém o gene em sua conformação inativa, como mencionado anteriormente ^(53, 54). A substituição de um aminoácido valina por um ácido glutâmico no produto protéico gera a subsequente ativação da enzima *BRAF* quinase.

A mutação *V600E* tem sido reportada em inúmeros tipos de tumores em humanos, em variadas frequências, sendo mais prevalente em melanomas e nevos, com respectivamente 66 e 82% de frequência ⁽⁵⁵⁾, por este motivo sendo chamada *hot spot*. Nos últimos cinco anos, vários artigos relatam mutações de *BRAF* em câncer de tireóide, tendo neste sua segunda prevalência, após o melanoma cutâneo. Foi também descrito em neoplasias colorretais ^(56, 57); sabe-se ainda que a mutação

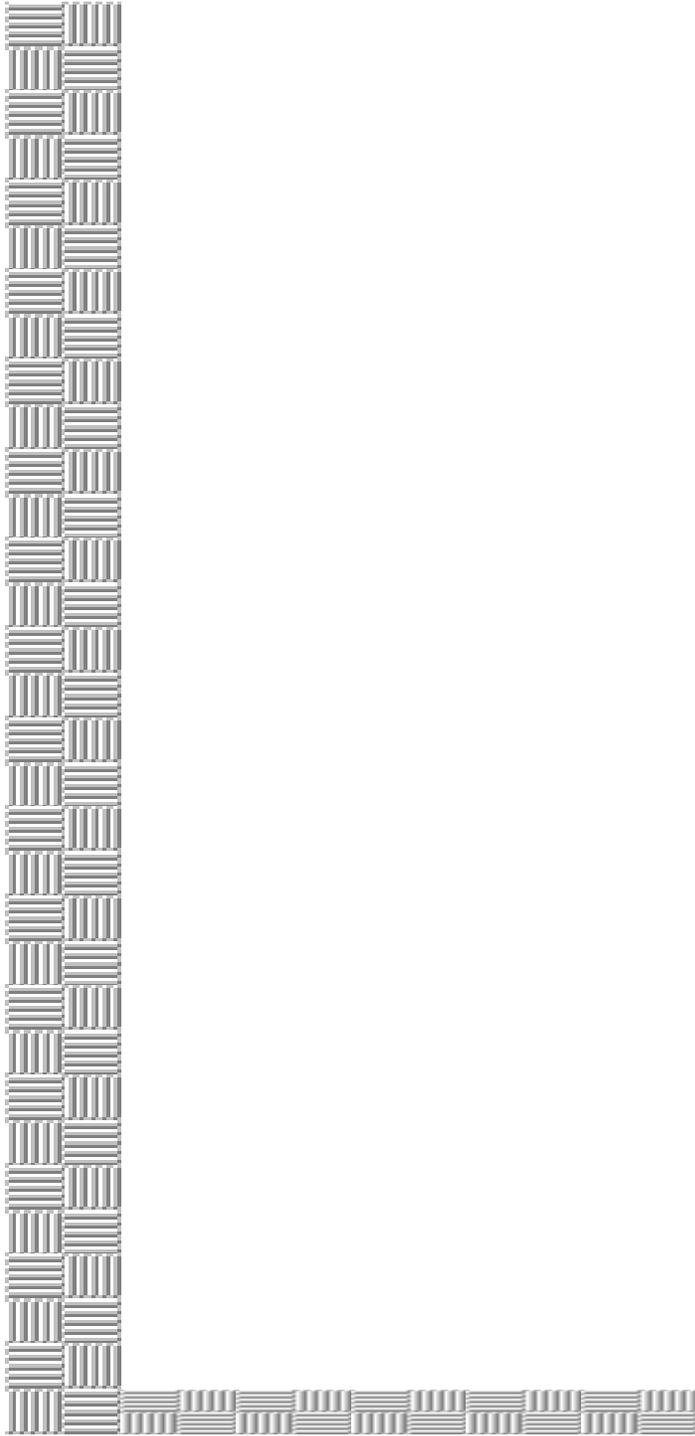
mantém a proliferação da célula tireoidiana, ocorrendo em estágios muito precoces da gênese do tumor, promovendo invasividade pela ativação de fatores de proliferação celular. É rara em crianças na sua forma esporádica de ocorrência, e apresenta baixa prevalência em tumores rádio-induzidos ^(58, 59). A descoberta desta alteração gênica criou a oportunidade do desenvolvimento de novas estratégias para o manejo do câncer de tireóide.

Recentemente foi descrito o rearranjo *PAX8/PPARgamma* também para a variante folicular do carcinoma papilífero e também para o carcinoma folicular, o que pode significar que a mesma partilha algumas das características dos carcinomas foliculares (as quais sabidamente expressam esta mutação em alguns de seus casos), sugerindo que ambas possam ser similares em sua origem, ampliando o campo de estudo dos tumores bem diferenciados na tireóide ⁽⁶⁰⁾.

Mais recentemente descreveram-se as primeiras alterações envolvendo variantes do carcinoma papilífero, como as mutações *K601E* para a variante folicular ⁽⁶¹⁾, fusões anômalas do oncogene *BRAF* com o gene *AKAP9* em tumores rádio-induzidos, e a mutação *T599-I VSKRdel* também para a variante folicular, o que pode significar que, apesar da citoarquitetura similar, estes tumores apresentariam origem genética distinta, explicando seu comportamento e evolução bastante diversos apesar de inseridos na mesma etiologia ⁽⁶²⁾, o que ainda é foco de controvérsia.

Outro grupo de estudo mostrou que 100% dos pacientes com a variante clássica do carcinoma papilífero apresentam a mutação de *BRAF* em tecidos linfonodais embora apenas 65% dos tumores primários correspondentes tenham a mutação ⁽⁶³⁾. Estes dados sugerem fortemente que as mutações de *BRAF* estão associadas à progressão do tumor.

Muito embora a mutação de *BRAF* já seja bem estabelecida como fator oncogênico, o papel de sua expressão ainda é controverso, tanto em termos prognósticos quanto em relação à suscetibilidade ao carcinoma papilífero. Inicialmente bem demonstrada em tumores hipofisários não funcionantes ⁽⁶⁴⁾, a seguir foi postulado por Kondo *et al.*, em 2007, que esta superexpressão nos carcinomas tireoidianos ocorreria independentemente da presença da mutação *hot spot* ⁽⁶⁵⁾, o que recentemente foi contestado por Watanabe *et al.* em 2009 ⁽⁶⁶⁾. Permanece incerto, portanto, o papel da hiperexpressão de *BRAF* na gênese dos tumores epiteliais tireoidianos, e a literatura ainda não dispõe de dados que permitam correlacionar esta expressão com maior ou menor suscetibilidade ao carcinoma papilífero.

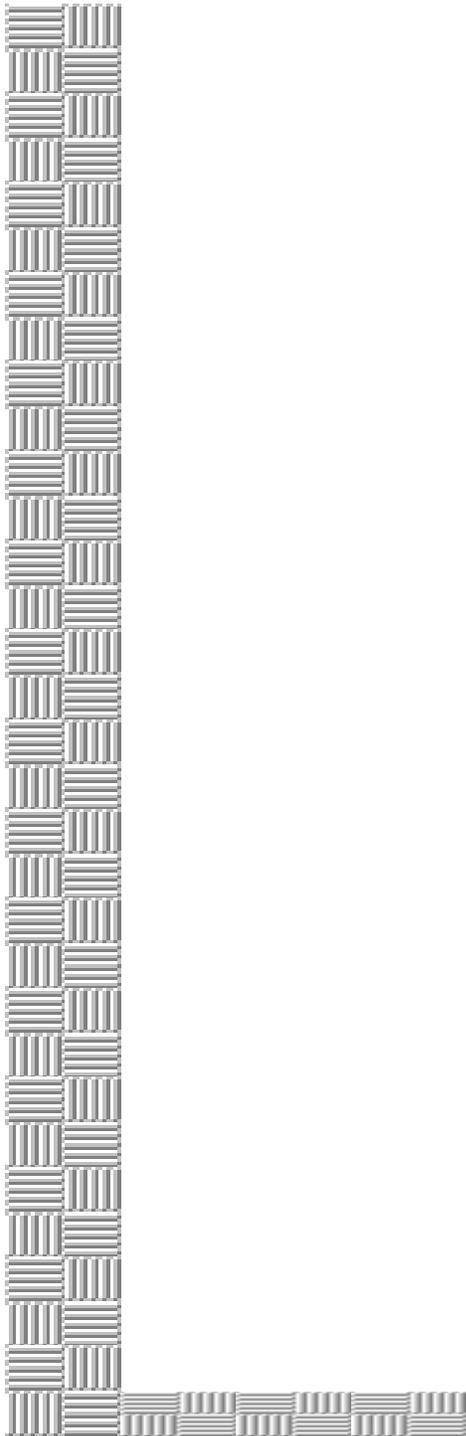


II. Objetivos

II. OBJETIVOS

Dadas algumas dificuldades diagnósticas ainda vigentes em casos indeterminados (não-conclusivos) para carcinoma papilífero da tireóide e devido às dificuldades em se estabelecer um prognóstico individualizado, este trabalho objetivou:

1. Detectar e mensurar a expressão do gene *BRAF* em tecido tireoidiano normal e neoplásico pela técnica de *quantitative real-time PCR (qRT-PCR)* de modo a tentar definir esta expressão gênica também como um marcador para malignidade quando correlacionada com os fatores clínicos e epidemiológicos coletados;
2. Verificar a ocorrência da mutação *hot spot* no gene *BRAF* em amostragem dentro da casuística para demonstrar sua frequência;
3. Correlacionar os achados de expressão com o prognóstico clínico dos pacientes estudados de modo a traçar um perfil molecular de risco que possa estar associado à maior ou menor expressão do gene *BRAF*.



III. Casuística e Método

III. CASUÍSTICA

III.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Este estudo prospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e registrado como projeto FAPESP sob número 2009//00643-0 , sendo que todos os pacientes ou responsáveis pelos mesmos forneceram seu material para estudo sob consentimento informado após explicação concisa sobre o tratamento a ser aplicado.

Cento e sessenta e seis doentes foram consecutivamente atendidos em ambulatório de clínica privada no período de fevereiro de 2006 a março de 2007 e tiveram coletados tecido neoplásico e tecido normal no ato operatório. Destes, 63 eram portadores de carcinoma papilífero da tireóide e os outros 103 correspondiam a lesões benignas e outros tipos de neoplasias. O tecido dito normal foi marcado com suturas e conferido histologicamente.

III.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes portadores de nódulos neoplásicos tireoidianos candidatos à cirurgia em tireóide.

III.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA OS TUMORES MALIGNOS

Dentre os 63 pacientes portadores de carcinomas papilíferos, foram excluídos da análise da expressão 31 pacientes cujo material não foi adequadamente processado em laboratório para o estudo, devido à perda de material e/ou armazenamento inadequado para a coleta de mRNA, sendo, portanto, 32 pacientes estudados.

III.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA OS NÓDULOS BENIGNOS

Dos 103 pacientes com nódulos benignos 68 casos foram excluídos do estudo comparativo para a expressão com os casos malignos por não apresentarem todos os dados clínicos necessários à correlação estatística desejada. Portanto, 35 pacientes foram estudados.

III.5. DA POPULAÇÃO DE 32 PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA PAPILÍFERO

III.5.1. Sexo

O sexo predominante foi o feminino em 28 pacientes (87,5%).

III.5.2. Idade

A média de idade foi de 49,3 anos, variando entre 33,1 e 65,5 anos, sendo que 30 pacientes (71,4%) apresentava idade maior de 45 anos.

III.5.3. Estádio clínico

Onze (55%) eram classificados como estágio I, sete (35%) como estágio II, dois (10%) como estágio III de acordo com o sistema TNM ⁽²⁶⁾. Não havia pacientes em estágio IV.

III.6. DAS CARACTERÍSTICAS DOS 32 TUMORES MALIGNOS

III.6.1. Tamanho das lesões ao estudo ultrassonográfico

Vinte e cinco pacientes (89%) apresentaram tumores variando de 0 a 2 cm e três (10,7%), destes, dezenove (65,5%) correspondiam a microcarcinomas (menos de um cm de diâmetro); três correspondiam a tumores entre 2 a 4 cm (10,7%). Quatro pacientes não tiveram este dado informado adequadamente ao ultrassom.

III.6.2. Critérios ultrassonográficos

Quatro pacientes (13,8%) tiveram linfonodos reportados como suspeitos ao ultrassom pré-operatório. Nove pacientes (40,9%) apresentaram a característica de suspeição *hipoecogenicidade* ao ultrassom, sendo que em mais de uma lesão (4,5%) o nódulo foi definido como iso/hipoecogênico; três pacientes (14,3%) apresentaram fluxo central ao estudo doppler, três (14,3%) fluxo

periférico e dez (47,6%) fluxo considerado negativo. Em onze casos estes dados não foram relatados.

III.6.3. Das características de agressividade anátomo-patológica

Desmoplasia foi encontrada em três casos (10,7%) e multifocalidade em quatro casos (14,3%). Não houve nenhum caso de invasão extracapsular e/ou calcificações na amostra estudada. Dos quatro linfonodos suspeitos, dois foram positivos à histologia (50%).

III.6.4. Valores de expressão de mRNA BRAF

Vinte e nove pacientes (90,6%) apresentaram expressão de *BRAF* entre uma a 500 unidades arbitrárias (UA), um (3,1%) entre 500 e 1000 UA, e dois (6,3%) acima de 1000 UA.

III.6.5. Ocorrência da mutação V600E de BRAF

Nove em 32 pacientes (28,1%) apresentaram a mutação.

III.7. DAS LESÕES BENIGNAS

Dos 35 pacientes selecionados para o estudo comparativo de risco para a expressão de *BRAF*, sete (20%) eram portadores de adenomas foliculares e 28 (80%) correspondiam a bócios atóxicos multinodulares. Vinte e sete pacientes (77,1%) eram do sexo feminino.

III.8. CIRURGIA E SEGUIMENTO DOS 67 DOENTES (CASOS MALIGNOS E BENIGNOS)

III.8.1. Cirurgia

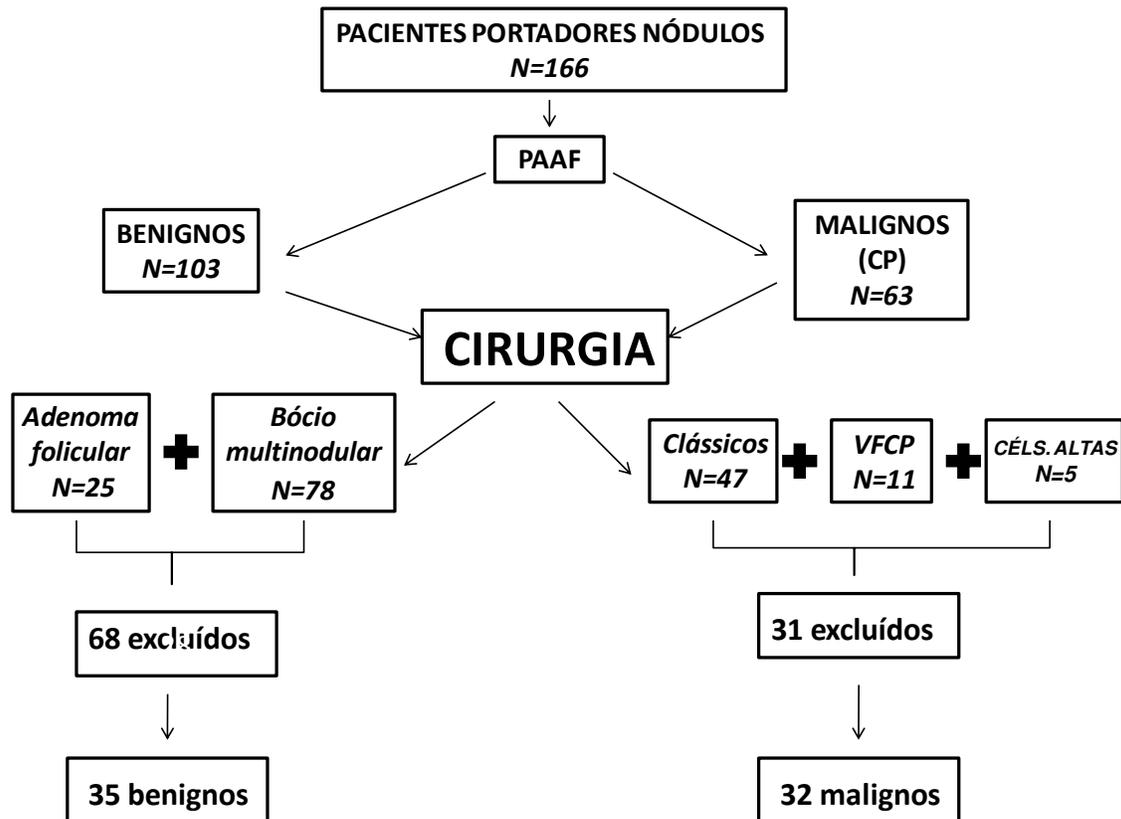
Todos os 67 pacientes portadores de nódulos benignos e malignos foram submetidos a cirurgia para tratamento e tiveram seu material (tumor e tecido normal) coletados para análise histo-patológica e molecular. A tireóidectomia total foi o procedimento padrão para os casos de neoplasia maligna. A mesma também foi realizada em nódulos benignos quando havia nódulos múltiplos dispersos pelo parênquima glandular detectados inicialmente por exame clínico e/ou ultrassonográfico. Em quatro pacientes (12,5%) portadores de carcinoma papilífero houve, além da tireoidectomia total, esvaziamentos cervicais recorrentiais por conta dos linfonodos suspeitos detectados aos exames iniciais.

III.8.2. Seguimento clínico dos pacientes

A tireoglobulina foi utilizada para o seguimento dos pacientes com carcinoma papilífero, e considerada em níveis adequados em 15 (71,4%) dos pacientes durante o seguimento por estar abaixo de 0,2 ng/mL. Todos foram submetidos à ablação de remanescentes com dosagens padronizadas em, no mínimo, 100 mCi após o que os pacientes foram seguidos periodicamente com pesquisas de corpo inteiro (PCI) e novas medidas de tireoglobulina de acordo com um protocolo de seguimento. Este incluía raios X de tórax, ultrassonografia cervical e de outras regiões anatómicas

caso houvesse suspeita de acometimento destes locais. O tempo de seguimento médio foi de 5 a 56 meses ($21,3 \pm 12,45$ meses). Pacientes com altos níveis de tireoglobulina e/ou PCI suspeitas para envolvimento a distância foram submetidos a exames de imagem, incluindo a tomografia computadorizada se necessário, para localizar a doença. Os pacientes com recidivas localizadas e tratadas, a despeito de novos níveis normalizados de tireoglobulina pós-tratamento da recorrência, foram considerados de mau prognóstico, e os pacientes restantes livres de progressão foram considerados de boa evolução e prognóstico.

Figura 2. Distribuição dos 67 pacientes da casuística demonstrando a classificação à punção aspirativa por agulha fina, os diagnósticos histológicos a amostragem final considerada para estudo



IV. MÉTODO

Os pacientes foram submetidos a uma rotina de avaliação diagnóstica e seguidos de acordo com um protocolo padronizado. Todos os pacientes foram operados e acompanhados por uma mesma equipe multidisciplinar tendo todos os diagnósticos anátomo-patológicos confirmados por patologistas experientes em patologias da tireóide.

IV.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE BRAF

RNA_m foi isolado de tecido fresco congelado utilizando-se o protocolo do TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD), de acordo com o protocolo. Todas as reações em real time PCR (qRT-PCR) foram realizadas utilizando-se o sistema *ABI Prism 7700* e o kit *Taq man EZ RT-PCR* (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, USA).

As sequências iniciadoras (*primers*) e a sonda (*probe*) foram desenvolvidas de acordo com o programa *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems) utilizando-se a sequência M95712 do *Gen Bank* encontrado no endereço eletrônico:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=41397219>, e

descritos como a seguir: *sense* 5' – CTGGCCCGCTATTGC – 3'

e *anti sense* 5' - CCGATTCAAGGAGGGTTCCTG – 3'.

A mistura para a reação continha 0,5 uL de tampão ROX, 12,5 uL de corante SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals), 2 uL de cada *primer*, 4uL de cDNA e água destilada graduada para se completar um volume de 25 uL. Os tubos eram preenchidos com esta mistura e a corrida padrão iniciava-se a 95° C por 5 minutos, seguida por quarenta ciclos a 95°C por quinze segundos para desnaturação, reanelamento a 60°C por um minuto e fase de extensão a 72°C por quinze segundos.

Uma curva padrão para se estimar a eficiência da PCR em tempo real foi utilizada e curvas de dissociação foram geradas de modo a verificar amplificação não-específica (Gráfico 1) . Cada amostra era examinada em triplicata e os controles foram rotineiramente obtidos. A normalização foi feita utilizando-se o gene GAPDH como padrão interno. Picos de onda foram gerados automaticamente após o processo de ciclagem significando medidas contínuas de fluorescência agregada à temperatura de desnaturação esperada, assegurando assim a ausência de produtos duplicados para cada reação específica.



Gráfico 1. Resultado visual final de um ciclo completo de PCR em tempo real (*qRT-PCR*) para um determinado grupo de amostras. Notar a intensa diferença entre a amplitude das duas curvas sigmóides, revelando a grande diferença entre a expressão da amostra estudada (direita) e do controle interno (esquerda).

Os pacientes tiveram a análise numérica de suas expressões tabuladas e plotadas de forma gráfica pelo programa, como a seguir (Gráfico 2).

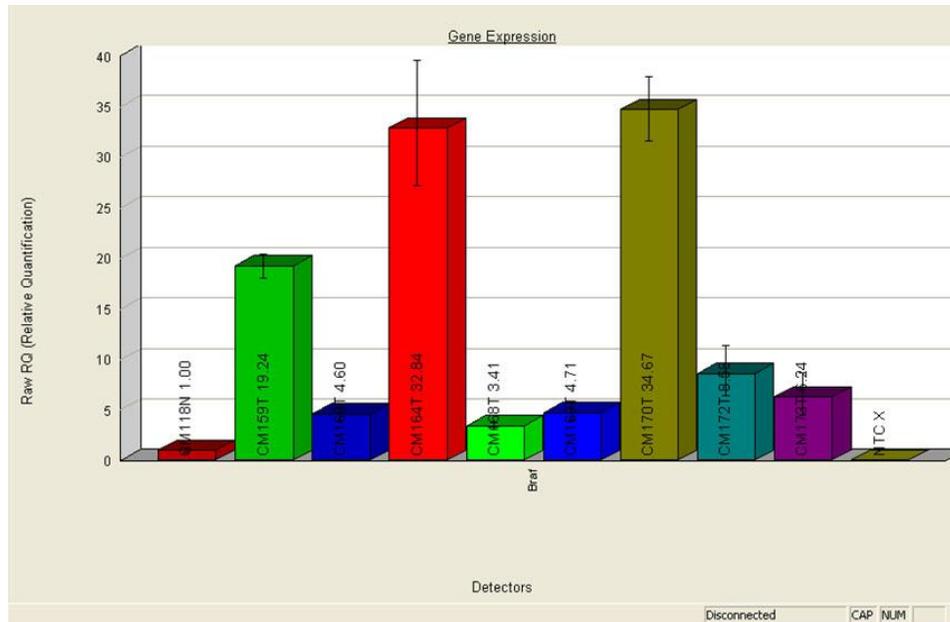


Gráfico 2. Exemplo de distribuição gráfica dos resultados de uma placa com amostragem de oito pacientes e resultado visual dos dados referentes à expressão de *BRAF* em relação ao controle negativo (NTC, à direita) e ao calibrador (CM 118N, à esquerda), gerada pelo programa *Primer Express* após ciclo de *qRT-PCR*

IV. 2. ANÁLISE DA MUTAÇÃO HOT SPOT DE BRAF

A análise da mutação de *BRAF* no exon 15 foi amplificada por reação convencional de polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se os seguintes *primers*:

sense 5' - GCTTGCTCTGATTGAGGGAAAA – 3'

antisense 5' - GATACTCAGCAGCATCTCAGG – 3'.

As condições da PCR foram: denaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguidos por mais quarenta ciclos de denaturação a 94°C por vinte segundos, anelamento a 56°C por vinte segundos e extensão a 72°C por dez minutos. Os

produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posteriormente à ação da enzima de restrição *TspRI* (New England Biolabs, INC). A leitura dos resultados se fez após coloração do gel em brometo de etídio e submissão à iluminação ultravioleta para visualização. A mutação *hot spot* (*V600E*) cliva os sítios de restrição, resultando numa banda de 224 pares de bases referente ao alelo mutante e bandas residuais do alelo normal, como observado na Figura 3.

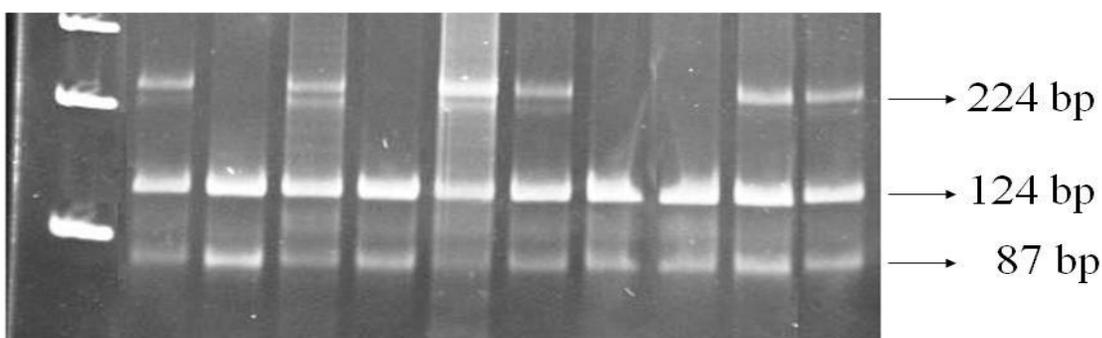


Figura 3. Gel em agarose a 2% com coloração por brometo de etídio, demonstrando a mutação *V600E* de *BRAF* em amostra de tecido de carcinoma papilífero de tireóide (fragmento de 224 pb)

Para a análise de prognóstico convencionou-se dividir a expressão quantitativa de *BRAF* classificada de uma a mil unidades arbitrárias (UA). Os pacientes foram divididos em grupos A (expressão leve, 1 a 500 UA), B (expressão moderada, de 500 a 1000 UA) e C (hiperexpressão, > 1000 UA). Dados clínicos, laboratoriais e anátomo-patológicos referentes tanto ao diagnóstico quanto ao

seguimento foram analisados correlacionando-se o valor das expressões obtidos. Para análise de prognóstico foram identificados e excluídos da amostra os casos com mutação de *BRAF* positiva.

V. 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software SAS/STAT (*Statistical Analysis System*) versão 8.2 (Cary NC, USA, 1999-2001) foi utilizado para as análises estatísticas.

O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para se verificar a significância estatística para as diferenças absolutas de expressão entre nódulos benignos e malignos.

Uma curva ROC (*receiver operating characteristic*) foi construída plotando-se a sensibilidade (casos realmente positivos para neoplasia) no eixo Y e o complemento da especificidade (a proporção de *falsos positivos*, ou seja, os inicialmente suspeitos porém não confirmados, *1- spec*) no eixo X para diferentes pontos de corte relacionados à expressão de *BRAF*.

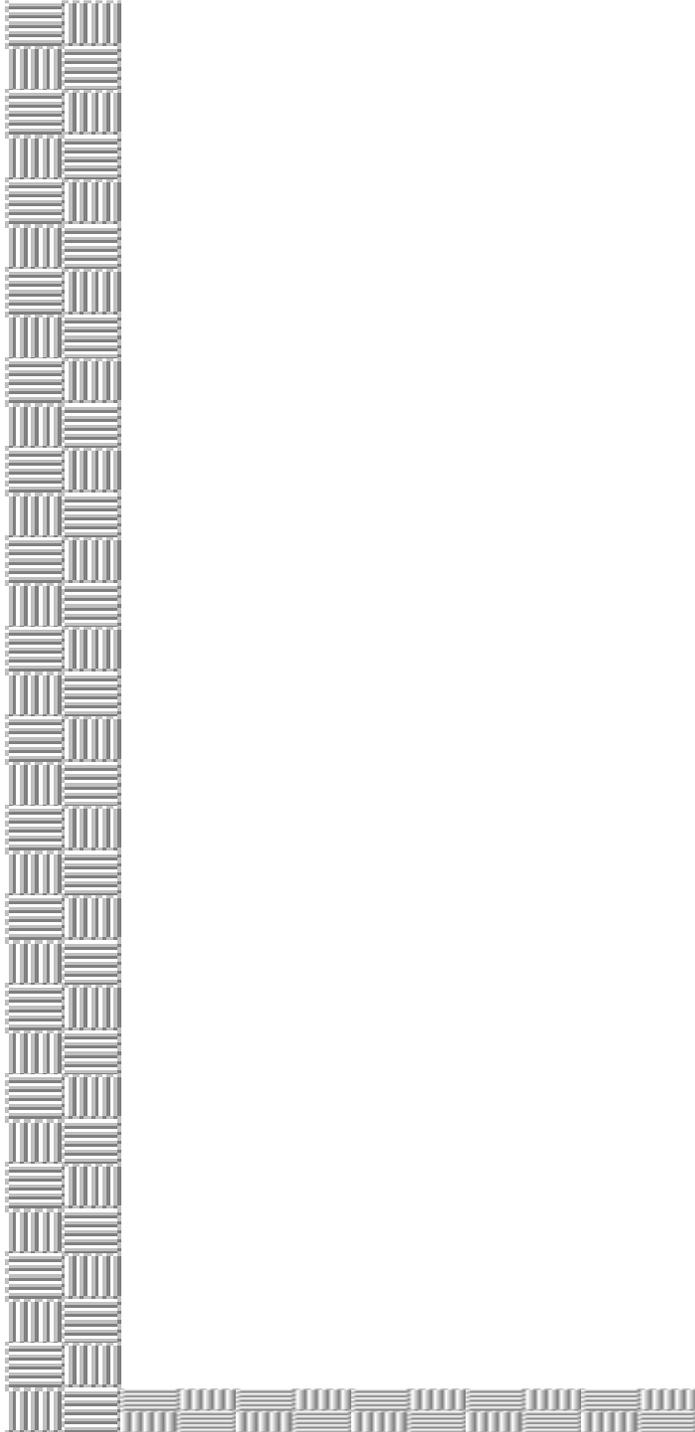
Sensibilidade, especificidade e valores preditivos foram calculados segundo fórmulas padronizadas e o teste exato de Fisher foi utilizado para demonstrar a associação entre estes e o nível de significância da mesma.

O teste qui-quadrado foi utilizado para o cálculo do risco relativo para malignidade (*odds ratio*).

A associação entre a expressão de *BRAF* e sobrevida foi testada utilizando-se o teste de associação de probabilidades de Spearman.

A força de associação do estudo e a probabilidade reportada para falsos positivos (*FPRP*, *false-positive report probability*) foi calculada segundo Wacholder *et al.* ⁽⁶⁷⁾. Esta representa a probabilidade de uma observada associação em estudo ser ou não um resultado falso positivo. Considera-se $FPRP > 0,5$ indicativo de associação válida (digna de nota), quando pequenas casuísticas.

O nível de significância aceito foi de 5%.



V. Resultados

V. RESULTADOS

V.1. DADOS SOBRE PREDISPOSIÇÃO / SUSCEPTIBILIDADE OBTIDOS PELA EXPRESSÃO DE mRNA BRAF

Os valores de expressão de *BRAF* foram significativamente maiores em nódulos com resultado anátomo-patológico maligno para carcinoma papilífero ($198,2 \pm 373,9$ UA) do que em nódulos de etiologia benigna ($4,1 \pm 6,9$ UA; $p < 0,0001$), como demonstra a Tabela 3.

EXPRESSÃO BRAF									
grupo	n	média	desvio-padrão	minimo	mediana	maximo	IC 95% - Limite Inferior	IC 95% - Limite Superior	Valor-p
benignos	35	4,1	6,9	0,007	1,3	37,2	1,7	6,5	< 0.0001
malignos	32	198,2	373,9	0,83	31,5	1495,8	63,4	333,0	

Tabela 3. Valores absolutos para a expressão de mRNA BRAF nos tumores malignos e benignos, demonstrando os limites mínimos e máximos de expressão e a significância estatística desta diferença

O Gráfico 3 ilustra visualmente esta diferença.

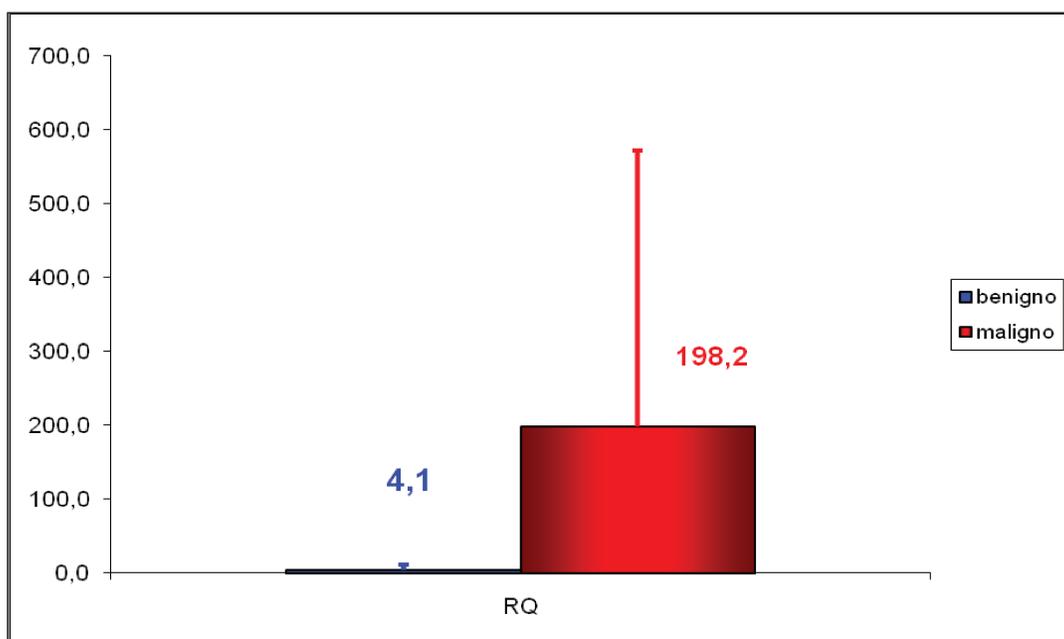
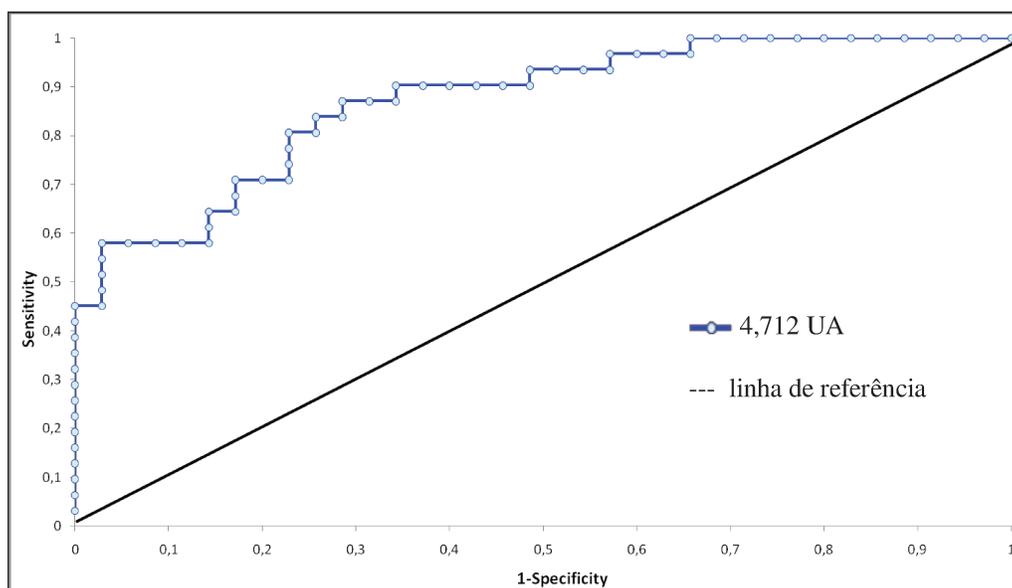


Gráfico 3. Diferença entre o maior pico de expressão de *BRAF* para nódulos benignos (azul) e malignos (vermelho) da amostragem estudada

Um ponto de corte (*cut off*) de 4,712 UA, identificado por uma curva ROC (Gráfico 4), foi capaz de discriminar nódulos malignos com uma acurácia de 79,1%, valor preditivo positivo de 76,5%, sensibilidade de 81,3% e especificidade de 77,1%, como descrito a seguir na tabela 4.

Gráfico 4. Distribuição dos 67 casos estudados pela curva ROC para a expressão de *mRNA BRAF* para diferenciação de nódulos benignos e malignos utilizando-se o valor de ponto de corte 4.712.



	Malignos n (32)	Benignos n (35)	Total n (67)	VPP	SENs.	VPN	ESP	ACUR	p
<i>mRNA</i> ≥ 4.712	26	8	34	76,5	81,3	81,8	77,1	79,1	< 0.0001
<i>BRAF</i> < 4.712	6	27	33						
				IC (95%)	67,7 94,8		63,2 91,1	69,4 88,8	

Tabela 4. Sensibilidade, especificidade e valores preditivos para os pacientes portadores de carcinoma papilífero x nódulos benignos da amostra estudada, considerando-se o ponto de corte identificado.

Quanto ao risco para malignidade, tivemos que, na diferenciação dentre nódulos benignos e malignos, a expressão, quando acima do ponto de corte, elevou o risco em 14 vezes, como ilustrado na Tabela 5.

Tabela 5. *Odds ratio* (razão de chances) calculada para a expressão de mRNA de *BRAF* entre os pacientes portadores de nódulos benignos e malignos, representando o risco relativo para malignidade para a expressão acima do ponto de corte

	BENIGNOS		MALIGNOS		p	OR (CI 95%)
	n	%	n	%		
	35		32		Total	
<i>mRNA BRAF</i>					<0.0001	
≥ 4.712	8	22.9	26	81.3	34	
<4.712	27	77.1	6	18.7	33	14.06 (4.28 to 46.23)

V.2. DADOS PROGNÓSTICOS E A EXPRESSÃO DE mRNA BRAF

Não houve correlação significativa entre a expressão de *BRAF* (excluídos os casos portadores da mutação) e sobrevida ($r=0,54$; $p=0,007$), como demonstrado na Tabela 6. Não foi possível calcular curvas de sobrevida.

Tabela 6. Distribuição dos 23 pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireóide demonstrando o índice de correlação de Spearman entre expressão e sobrevida. Foram excluídos os nove pacientes portadores da mutação *V600E*.

Características	n	r	valor-p do r
Total	23	0,5408	0,0077
Com Recidiva/óbito	1	Não calculável	
Sem Recidiva/óbito	22	0,4333	0,0213

V.3. VERIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO CONVENCIONAL

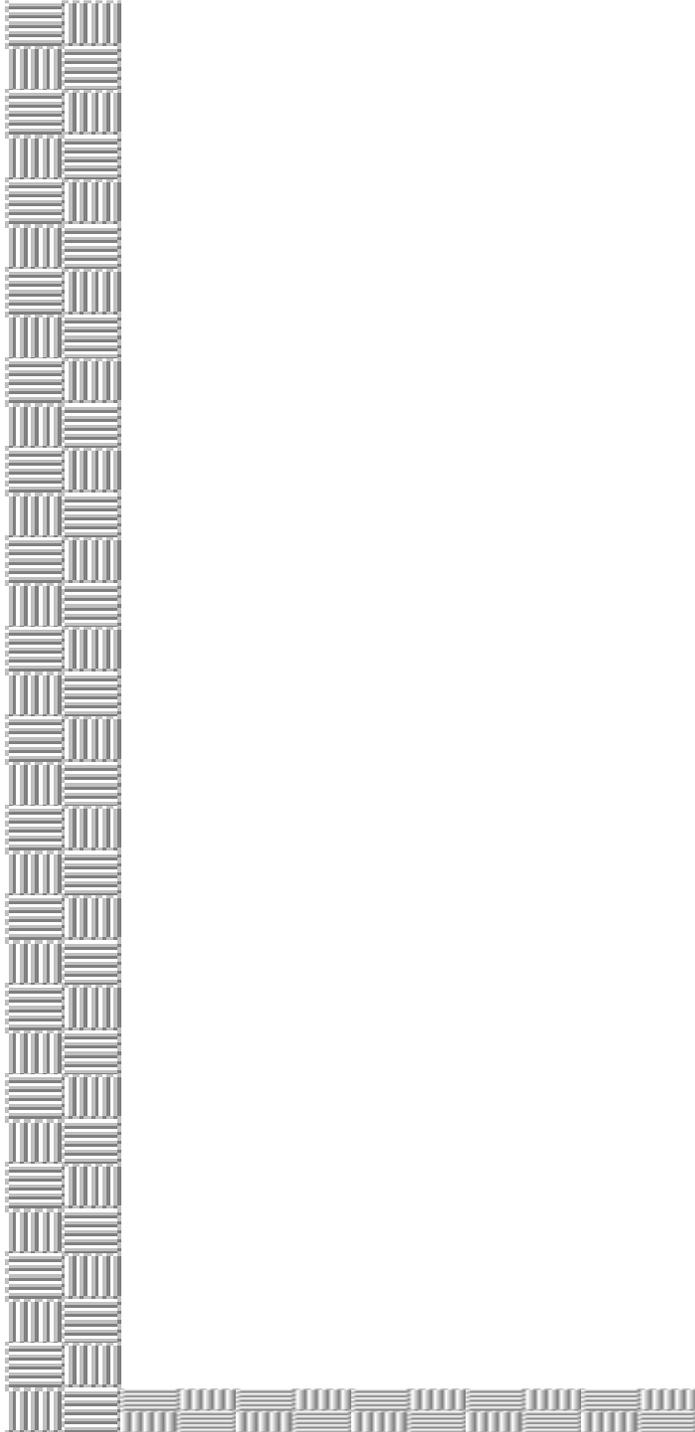
Dos 32 pacientes, nove (28,1%) apresentaram a mutação *hot spot*, sendo que todos eles eram pertencentes ao grupo C.

V.4. SOBRE O PODER DO ESTUDO E CÁLCULO DA PROBABILIDADE PARA FALSOS POSITIVOS REPORTADA (FPRP)

O poder do estudo para a expressão de *BRAF* e evolução foi de 99% e o valor de FPRP 0,84, como demonstrado na tabela 7.

	PROBABILIDADE EVENTO CÂNCER	p	α	OR (IC 95%)	Poder	FPRP
<i>mRNA</i>				14.06 (4.28 a		
<i>BRAF</i>	32/67	0,48	0,05	46.23)	0,99	0,84

Tabela 7. Probabilidade de evento, poder do estudo e valor do FPRP para os 32 casos de carcinoma papilífero com expressão de *BRAF* determinada por *qRT-PCR*



VI. Discussão

VI. DISCUSSÃO

VI.1. GENERALIDADES

O carcinoma papilífero de tireóide é a neoplasia endócrina mais comum em humanos, correspondendo a cerca de 1% de todos os tumores malignos, afetando principalmente mulheres ⁽⁶⁸⁾. Devido às novas tecnologias em imagem, especialmente com o advento da ultrassonografia de alta resolução, a sensibilidade para a detecção de nódulos e as técnicas para punção e diagnóstico citológico tiveram grande evolução. Contudo, estes métodos também levaram à identificação de tumores cada vez menores, que possuem seu significado clínico questionável a despeito do diagnóstico de câncer, sendo um grande número destes de pouca relevância clínica ⁽⁶⁹⁾. Temos ainda que as estratificações de risco nem sempre são concisas sobre o seguimento a ser adotado para cada paciente ⁽⁷⁰⁻⁷³⁾. Uma série de técnicas modernas, incluindo imunohistoquímica e análises moleculares têm sido aplicadas na tentativa de se estabelecer o diagnóstico de malignidade e realizar distinção de gravidade entre os nódulos de relevância. Infelizmente, todos os marcadores descritos até o momento, incluindo a detecção imunohistoquímica de *BRAF*, demonstraram sérias limitações ^(65, 74, 75).

Embora 60 a 70% dos carcinomas papilíferos de tireóide possam apresentar mutações ativadoras em *RAS*, uma mutação no gene *BRAF* ou um rearranjo *RET/PTC* com subsequente ativação da via de sinalização *RAS/RAF/MAPK* também mostraram correlação com a progressão da doença em carcinomas humanos ⁽⁷⁶⁾.

Apesar do vasto conhecimento a respeito da mutação *hot spot* de *BRAF*, a utilidade clínica da expressão de *BRAF* como um indicador de doença não foi explorada até o momento, e é bem estabelecido também que cerca de 20% a 30% dos nódulos submetidos à punção aspirativa por agulha fina são diagnosticados como indeterminados ⁽⁷⁷⁾.

VI.2. CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO ATUAL

O presente trabalho demonstrou que a ativação do gene *BRAF*, determinada pelos altos níveis de expressão encontrados, ocorreu de modo quantitativamente superior nos carcinomas papilíferos quando comparada aos adenomas foliculares ou bócios, identificando assim um possível marcador de predisposição à malignidade.

Nódulos com hiperexpressão de *BRAF* acima do ponto de corte apresentam um risco relativo para carcinoma papilífero 14 vezes maior (como observado na tabela 5), corroborando o primeiro achado.

No presente estudo foi quantificada a expressão em espécimes cirúrgicos, porém este método poderia ser perfeitamente aplicável ao material citológico obtido por punção por agulha fina, criando assim uma importante ferramenta diagnóstica factível, de boa sensibilidade, especificidade e acurácia e reproduzível em larga escala, de acordo com o postulado por Mitteldorf e cols. em 2008, muito embora este não tenha feito referência específica a *BRAF* ⁽⁷⁸⁾. Embora trabalhos recentes sobre o estudo da mutação em material citológico tragam alguma luz à questão, estes

carecem de definição sobre sua utilidade diagnóstica, e reportam-se a possíveis questões prognósticas quando da ocorrência da mutação ⁽¹⁹⁾. Observa-se que, além desta confirmação necessária, ainda há a necessidade de verificação do diagnóstico por outros métodos, tornando-o ainda mais caro e de pouca confiabilidade na prática clínica ^(79, 80). Não há dados de nosso conhecimento na literatura correlacionando o nível de expressão de *BRAF* em espécimes citológicos e sua possível utilidade diagnóstica, portanto os dados deste trabalho poderão ter sua aplicabilidade clínica.

O poder do estudo para a expressão de *BRAF* e evolução foi de 99% e o valor de FPRP 0,84, indicando que os dados diagnósticos para este grupo analisado foram válidos e significativos, a despeito do pequeno número de pacientes investigado.

Watanabe *et al.* (2009) demonstraram que a expressão variável da mutação *hot spot* pode modificar características de carcinomas papilíferos através de seus efeitos na expressão gênica ⁽⁶⁶⁾. Portanto, as medidas de expressão quantitativas de *BRAF*, em conjunto com outros critérios clássicos de prognóstico, poderiam auxiliar na identificação de pacientes de mais alto risco e individualizar a melhor estratégia terapêutica para cada paciente.

No presente trabalho esta correlação não foi possível dado o pequeno número de casos estudados e, mais relevante ainda, dado o fato de que os pacientes ainda possuem curto tempo de seguimento e até o momento não apresentaram critérios de mau prognóstico (recidiva e/ou óbito pela doença), a não ser por um caso. O dado obtido pelo teste de associação de Spearman demonstrou correlação não significativa, porém isto pode dever-se aos fatores mencionados acima. Da mesma

forma o pequeno número de pacientes estudados para a mutação impediu a análise adicional em prognóstico com significância estatística para este subgrupo especificamente.

O intuito de se identificar a mutação foi, além de se verificar sua ocorrência, excluir estes casos da amostragem de tumores malignos e realizar novo estudo no qual pudéssemos demonstrar risco prognóstico independente da mutação para a expressão de *BRAF*, o que não foi possível dado o pequeno número de casos, mas que pode ser factível em casuísticas maiores.

V.3. A EXPRESSÃO DO GENE BRAF E OUTROS GENES MARCADORES

A expressão de *BRAF* parece representar um fator clínico independente de suscetibilidade que, em conjunto com outros marcadores moleculares, pode auxiliar na delineação de um modelo poligênico de risco para câncer bem diferenciado de tireóide entre uma grande população de indivíduos portadores de nódulos, mostrando assim um possível caráter diagnóstico como marcador. É plausível também que sua expressão se correlacione com a de *NIS* e *MUC*, assim como sabidamente com *RAS*, ajudando a definir casos de maior agressividade e propiciando assim uma maior individualização do tratamento quando de sua detecção.

Apesar do caráter indolente para a maioria dos doentes, há séries de casos em que a evolução do carcinoma papilífero é marcada por inúmeras recidivas ou

grande agressividade e invasão locais, sendo esta outra faceta da patologia que especificamente também indica mau prognóstico, e não somente evolução a óbito; para estes pacientes, muitas vezes não há mais a possibilidade de cura e com frequência há a diminuição da captação de iodo radioativo pelo tecido neoplásico em progressão ou recorrente, tornando muito difícil o tratamento pelos métodos convencionais. Assim, tratamentos novos e específicos são uma necessidade premente para estes casos.

A via *MAPK* tem uma posição chave dentro deste processo pelos motivos explicados inicialmente, e uma vez que ela pode ser ativada alternativamente por uma série de genes e interações, incluindo *BRAF* (por mutação e talvez por superexpressão, fica a sugestão a ser continuada neste trabalho), fica claro o papel de inibidores desta cascata, em suas mais variadas formas – desde os inibidores na gênese do processo quanto inibidores dos intermediários ou efetores da cascata de sinalização - como a delineação de um novo conceito de tratamento, assim chamado, portanto, terapia-alvo, na qual *BRAF* já vem sendo foco de estudo.

O presente trabalho visou elucidar estas características patogênicas também para a expressão, e não somente para a mutação; como ativadora da via de sinalização, a expressão pode ser ferramenta útil tanto na identificação de tumores quanto no prognóstico e tratamento.

Já existem esforços neste sentido, com o desenvolvimento de inibidores específicos *in vitro* e seu uso experimental em modelos animais ^(81, 82), alguns

compostos parecem ser bastante promissores interferindo na gênese do processo, como o chamado BAY 43 9006 ^(82, 83) que, embora inibindo indistintamente todos os genes da chamada família *RAF*, já possui efeito comprovado em células de cultura para melanoma, bloqueando a sinalização de *RAF* quinases e com isto inibindo a síntese do DNA e a proliferação celular que seria induzida por *BRAF*, levando à apoptose em células com a mutação *hot spot* em ratos cobaias ⁽⁸⁴⁾. Por outro lado compostos que atuam na via intermediária, como inibidores de *MEK* (CI-1040), agem em passos diferentes da cascata que não na ação iniciadora levando ao mesmo efeito final, mas ainda há dúvidas quanto à eficácia de certas substâncias e muitos estudos ainda não foram autorizados em humanos, portanto seus efeitos, bem como interações medicamentosas e efeitos colaterais seguem ainda desconhecidos ^(85, 86).

O presente trabalho identificou a expressão de *BRAF* como um importante fator capaz de predizer malignidade, mas não foi possível delinear associação prognóstica entre hiperexpressão e má evolução no mesmo, o que poderia ser realizado com o aumento da casuística e um maior tempo de seguimento observacional, de modo a tentar demonstrar correlação entre altos níveis de expressão e sobrevida. Este campo permanece aberto para estudos prospectivos posteriores que enfoquem seu papel não só no diagnóstico, mas também na progressão e agressividade destes tumores, assim como ocorre para a mutação. Objetivamos estas conclusões para um futuro próximo, em novo trabalho.

A despeito das dúvidas lançadas pelos poucos trabalhos a respeito do assunto na literatura, acreditamos que a expressão de *BRAF* pode realmente ser dependente do status da mutação, dada a grande diferença de valores absolutos entre nódulos benignos (em que sabidamente esta não ocorre) e malignos identificados pela descritiva e reforçados pelo teste de Mann-Whitney. Porém uma série de outros determinantes de efeito contrarregulador pode determinar esta hiperexpressão, visto que a cascata sinalizadora em que o gene está implicado é sabidamente muito complexa e envolve, como descrito inicialmente, uma série de potenciais ativadores e reguladores. *BRAF* seria apenas um intermediário, com poder próprio de ativação anômala pela mutação, porém de etiologia incerta pela expressão, motivo pelo qual delineamos este trabalho.

Artigos recentes colocam que a mutação de *BRAF* pode afetar a expressão de um grande número de genes, incluindo o próprio *BRAF* em si, de um modo notável⁽⁶⁶⁾, mas ainda são poucos os dados que relacionam esta expressão à modulação da gênese do tumor. O perfil de expressão gênica nos carcinomas papilíferos de tireóide sugere um painel variável no qual muitas fases do ciclo celular são estabelecidas progressivamente, do carcinoma bem diferenciado ao mais indiferenciado, e isto é marcado pela notória ativação de genes de proliferação celular⁽⁸⁷⁾. Alguns genes clássicos como *RET* também estão claramente superexpressos no carcinoma papilífero em comparação com tecidos não neoplásicos, apesar do papel do rearranjo *RET/PTC*⁽⁸⁸⁾. Além do mais, outros genes como *NATH* (assim chamado por sua similaridade de aminoácidos com o sistema N-acetil-transferase de *Saccharomyces*

cerevisiae, *NAT1*, têm significância desconhecida, apesar de sua comprovada superexpressão, por conta de poucos dados a respeito de sua função na proliferação e apoptose celular ^(89,90).

A superexpressão de *BRAF* também é encontrada em tumores hipofisários benignos, enquanto que a mutação *hot spot* não é um achado significativo nestas neoplasias, colocando assim evidência unicamente sobre a expressão como um marcador independente para a geração de neoplasias ⁽⁶⁴⁾. Dada a pequena casuística referente às mutações no presente trabalho, mais dados serão necessários para se estabelecer uma relação de causa e consequência entre hiperexpressão e mutação, uma vez que ainda não se sabe ao certo como se dá esta interação. Kondo *et al.* em 2007 determinaram que a superexpressão da proteína *BRAF* é independente do status mutacional nos carcinomas de tireóide ⁽⁶⁵⁾. Estes dados claramente evidenciam a importância de expressão de marcadores, tanto os bem conhecidos quanto os pouco estabelecidos em cancerologia e mais, fornecem algumas pistas a respeito do papel independente da expressão de *BRAF* no desenvolvimento e progressão neoplásicos a despeito da ocorrência ou não da mutação *hot spot*.

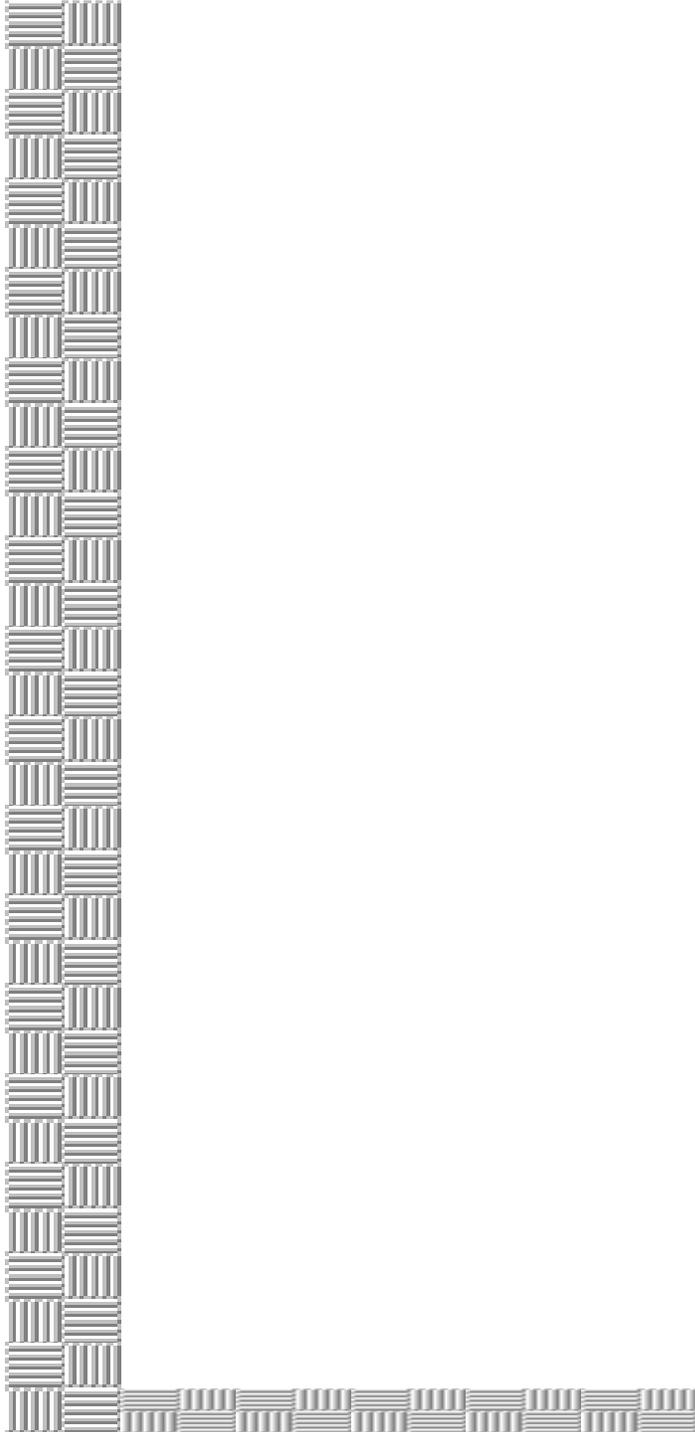
Apesar destes relatos, não é de nosso conhecimento até o momento nenhum trabalho na literatura envolvendo a expressão de *BRAF* e dados que intentaram realizar associação entre os achados moleculares e clínicos dos pacientes em questão de modo prospectivo, limitando-se os citados apenas à análise da mutação em espécimes emblocados para estudo e sua correlação com estudos sobre expressão.

Os dados do presente trabalho sugerem que a expressão de *BRAF* pode ajudar a identificar nódulos malignos com grande fidedignidade, boa acurácia e facilidade de execução, estabelecendo relação de risco relevante para malignidade diretamente proporcional à expressão a partir de determinado ponto de corte.

Aproximadamente cerca de 70% dos carcinomas papilíferos de tireóide portam mutações em *BRAF*, resultando numa ativação para a via das *MAP* quinases como exposto anteriormente. Acreditamos que, a partir da quantificação da expressão de *BRAF* e estudo de sua correlação com a mutação *V600E*, juntamente com os critérios clássicos de prognóstico clínico, seja possível delinear uma estratificação para pacientes de alto risco para má evolução.

Investigação adicional é necessária em maior casuística e por tempo maior de seguimento, de modo a testar a capacidade deste modelo.

A importância deste trabalho se revela nos achados diagnósticos e na sugestão da possibilidade de aplicação do método em material citológico, a fim de se verificar sua aplicabilidade em maior escala e testar a expressão de *BRAF* (e não somente a mutação) como marcador preditivo de malignidade, bem como testar também esta expressão como ferramenta com valor preditivo de sobrevida.

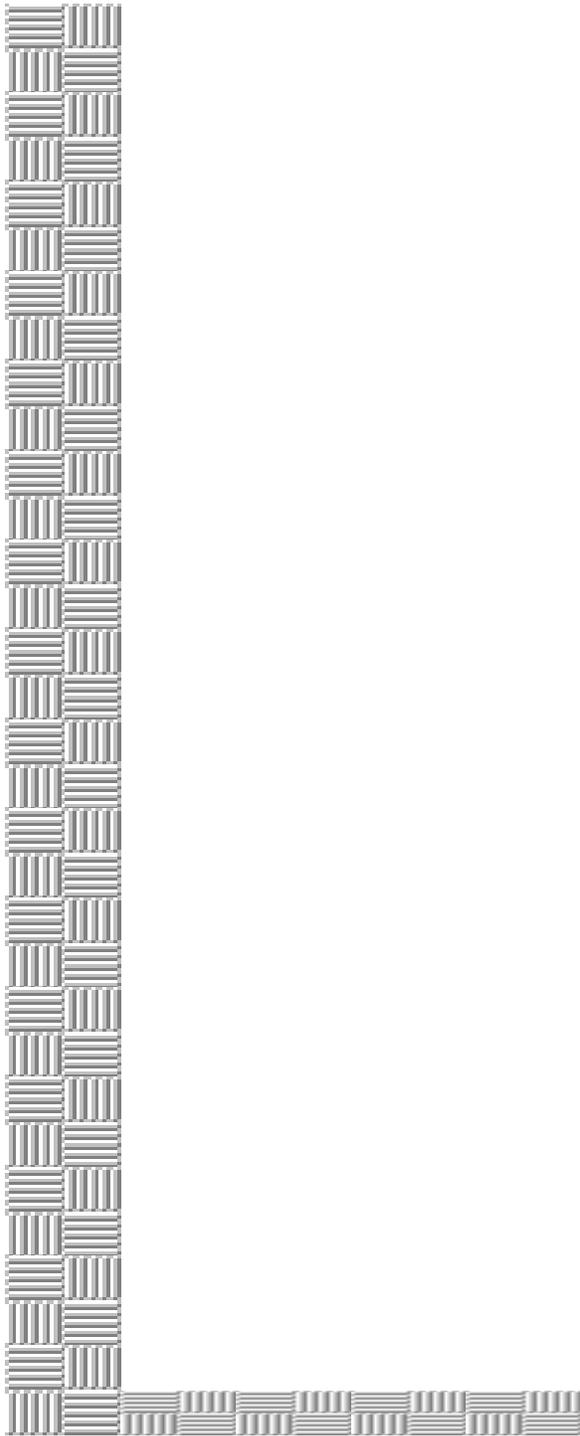


VII. Conclusão

CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

1. Foi possível detectar e mensurar a expressão do gene *BRAF* em tecido tireoidiano normal e neoplásico pela técnica de *quantitative real-time PCR (qRT-PCR)* definindo esta expressão gênica como um marcador para malignidade na amostra estudada;
2. Foi verificada a ocorrência da mutação *hot spot* no gene *BRAF* em 28,1% dos casos de carcinoma papilífero;
3. A correlação entre a expressão de *BRAF* nos pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireóide e má evolução neste trabalho, dentro dos limites da presente análise, não foi significativa.



VIII. Referências

VIII. REFERÊNCIAS

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004 Jan-Feb;54(1):8-29.
2. Knostman KA, Jhiang SM, Capen CC. Genetic alterations in thyroid cancer: the role of mouse models. *Vet Pathol.* 2007 Jan;44(1):1-14.
3. Lloyd RV DR, Heitz PU, Eng C. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press International Agency for Research of Cancer; 2004.
4. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. [cited]; Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>.
5. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro AP, Vaisman M. [Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005 Aug;49(4):503-9.
6. Instituto, Nacional, Câncer. d. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA In: Saúde Md, editor. Rio de Janeiro; 2007.
7. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see commetns]. *Cancer.* 1998 Dec 15;83(12):2638-48.
8. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005 Jun;12(2):245-62.

9. From G, Mellempgaard A, Knudsen N, Jorgensen T, Perrild H. Review of thyroid cancer cases among patients with previous benign thyroid disorders. *Thyroid*. 2000 Aug;10(8):697-700.
10. J.J. F. Epidemiology of thyroid cancer. In: L W, editor. *Thyroid Cancer: a Comprehensive Guide to Clinical Management*: Humana Press; 1999.
11. Preston-Martin S, Franceschi S, Ron E, Negri E. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? *Cancer Causes Control*. 2003 Oct;14(8):787-9.
12. Bertelsen JB, Hegedus L. Cigarette smoking and the thyroid. *Thyroid*. 1994 Fall;4(3):327-31.
13. Pontikides N, Krassas GE. Influence of cigarette smoking on thyroid function, goiter formation and autoimmune thyroid disorders. *Hormones (Athens)*. 2002 Apr-Jun;1(2):91-8.
14. Vestergaard P. Smoking and thyroid disorders--a meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2002 Feb;146(2):153-61.
15. Bufalo NE, Leite JL, Guilhen AC, Morari EC, Granja F, Assumpcao LV, et al. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13(4):1185-93.
16. Palli D, Vineis P, Russo A, Berrino F, Krogh V, Masala G, et al. Diet, metabolic polymorphisms and dna adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study. *Int J Cancer*. 2000 Aug 1;87(3):444-51.
17. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann Surg Oncol*. 1996 Nov;3(6):534-8.

18. Shaha AR. Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer. *Laryngoscope*. 2004 Mar;114(3):393-402.
19. Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, et al. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):2977-82.
20. Voutilainen PE, Siironen P, Franssila KO, Sivula A, Haapiainen RK, Haglund CH. AMES, MACIS and TNM prognostic classifications in papillary thyroid carcinoma. *Anticancer Res*. 2003 Sep-Oct;23(5b):4283-8.
21. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol*. 2004 Nov;183(2):249-56.
22. Nikiforov YE, Fagin JA. Risk factors for thyroid cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 1997 Jan-Feb;8(1):20-5.
23. Puxeddu E, Fagin JA. Genetic markers in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001 Jun;30(2):493-513.
24. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007 Dec;28(7):742-62.
25. Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, et al. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Arch*. 2005 Nov;447(5):787-93.
26. TNM Classification of Malignant Tumours. 6th ed. Sobin LH, Wittekind C, editors.: John Wiley and Sons, INC.; 2002.
27. Bongarzone I, Pierotti MA. The molecular basis of thyroid epithelial tumorigenesis. *Tumori*. 2003 Sep-Oct;89(5):514-6.

28. Fagin JA. Perspective: lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer--insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets. *Endocrinology*. 2002 Jun;143(6):2025-8.
29. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. 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*. 2003 Apr 1;63(7):1454-7.
30. Machens A, Lorenz K, Dralle H. Constitutive RET tyrosine kinase activation in hereditary medullary thyroid cancer: clinical opportunities. *J Intern Med*. 2009 Jul;266(1):114-25.
31. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;963:116-21.
32. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol*. 2002 Spring;13(1):3-16.
33. Tallini G. Molecular pathobiology of thyroid neoplasms. *Endocr Pathol*. 2002 Winter;13(4):271-88.
34. Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiother*. 2001 Apr;5(2):109-29.
35. Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jul;84(7):2449-57.

36. Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB, et al. Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Res.* 2003 May 1;63(9):2316-21.
37. Ward R, Hawkins N, O'Grady R, Sheehan C, O'Connor T, Impey H, et al. Restriction endonuclease-mediated selective polymerase chain reaction: a novel assay for the detection of K-ras mutations in clinical samples. *Am J Pathol.* 1998 Aug;153(2):373-9.
38. Chong H, Guan KL. Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36269-76.
39. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.* 2003 May;15(5):463-9.
40. Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie.* 2002 Dec;25(6):511-8.
41. Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell.* 2001 Sep;93(1-2):53-62.
42. Pollock PM, Meltzer PS. A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell.* 2002 Jul;2(1):5-7.
43. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci.* 1994 Nov;19(11):474-80.
44. Rapp UR, Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, Choi WC, Pawson T, et al. raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1988;53 Pt 1:173-84.

45. Kumagai A, Namba H, Takakura S, Inamasu E, Saenko VA, Ohtsuru A, et al. No evidence of ARAF, CRAF and MET mutations in BRAFT1799A negative human papillary thyroid carcinoma. *Endocr J.* 2006 Oct;53(5):615-20.
46. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH, Jr., et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jul;80(14):4218-22.
47. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
48. James MR, Roth RB, Shi MM, Kammerer S, Nelson MR, Stark MS, et al. BRAF polymorphisms and risk of melanocytic neoplasia. *J Invest Dermatol.* 2005 Dec;125(6):1252-8.
49. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 5;1653(1):25-40.
50. Sithanandam G, Druck T, Cannizzaro LA, Leuzzi G, Huebner K, Rapp UR. B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man. *Oncogene.* 1992 Apr;7(4):795-9.
51. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA.* 2006 May 10;295(18):2164-7.
52. Kumar R, Angelini S, Hemminki K. Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. *Oncogene.* 2003 Dec 18;22(58):9217-24.
53. Dhillon AS, Kolch W. Oncogenic B-Raf mutations: crystal clear at last. *Cancer Cell.* 2004 Apr;5(4):303-4.

54. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):855-67.
55. Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, Namkoong J, Martino JJ, Koganti A, et al. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet*. 2003 May;34(1):108-12.
56. Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, Saberi-Firoozi M, Al-Mandhari M, Al-Mawaly K, et al. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study. *Mol Cancer*. 2008;7:68.
57. Kumar K, Brim H, Giardiello F, Smoot DT, Nouraie M, Lee EL, et al. Distinct BRAF (V600E) and KRAS mutations in high microsatellite instability sporadic colorectal cancer in African Americans. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 15;15(4):1155-61.
58. Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, et al. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;89(9):4267-71.
59. Rosenbaum E, Hosler G, Zahurak M, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH. Mutational activation of BRAF is not a major event in sporadic childhood papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2005 Jul;18(7):898-902.
60. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jan;91(1):213-20.
61. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol*. 2004 Feb;202(2):247-51.

62. De Falco V, Giannini R, Tamburrino A, Ugolini C, Lupi C, Puxeddu E, et al. Functional characterization of the novel T599I-VKSRdel BRAF mutation in a follicular variant papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Nov;93(11):4398-402.
63. Oler G, Ebina KN, Michaluart P, Jr., Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Apr;62(4):509-11.
64. Ewing I, Pedder-Smith S, Franchi G, Ruscica M, Emery M, Vax V, et al. A mutation and expression analysis of the oncogene BRAF in pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Mar;66(3):348-52.
65. Kondo T, Nakazawa T, Murata S, Kurebayashi J, Ezzat S, Asa SL, et al. Enhanced B-Raf protein expression is independent of V600E mutant status in thyroid carcinomas. *Hum Pathol.* 2007 Dec;38(12):1810-8.
66. Watanabe R, Hayashi Y, Sassa M, Kikumori T, Imai T, Kiuchi T, et al. Possible involvement of BRAFV600E in altered gene expression in papillary thyroid cancer. *Endocr J.* 2009 Jun;56(3):407-14.
67. Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar 17;96(6):434-42.
68. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control.* 2009 Jul;20(5):525-31.
69. Pazaitou-Panayiotou K, Capezzone M, Pacini F. Clinical features and therapeutic implication of papillary thyroid microcarcinoma. *Thyroid.* 2007 Nov;17(11):1085-92.

70. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2006 Feb;16(2):109-42.
71. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*. 2006 Jun;154(6):787-803.
72. Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, et al. [Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jul;51(5):867-93.
73. Tuttle RM. Risk-adapted management of thyroid cancer. *Endocr Pract*. 2008 Sep;14(6):764-74.
74. Baloch ZW, LiVolsi VA. Fine-needle aspiration of the thyroid: today and tomorrow. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008 Dec;22(6):929-39.
75. Zeiger MA. Distinguishing molecular markers in thyroid tumors: a tribute to Dr. Orlo Clark. *World J Surg*. 2009 Mar;33(3):375-7.
76. Knauf JA, Fagin JA. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Apr;21(2):296-303.
77. Gharib H, Papini E, Paschke R. Thyroid nodules: a review of current guidelines, practices, and prospects. *Eur J Endocrinol*. 2008 Nov;159(5):493-505.
78. Mitteldorf CA, de Sousa-Canavez JM, Massumoto C, da Camara-Lopes LH. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules as a possible source for molecular studies: analysis of RNA obtained from routine cases. *Diagn Cytopathol*. 2008 Dec;36(12):899-903.

79. Sapio MR, Guerra A, Posca D, Limone PP, Deandrea M, Motta M, et al. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Dec;14(4):1089-97.
80. Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S, Frigato G, Buratto M, Tagliati F, et al. BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine needle aspiration biopsies. *Eur J Endocrinol*. 2009 Jul 2.
81. Wilhelm S, Chien DS. BAY 43-9006: preclinical data. *Curr Pharm Des*. 2002;8(25):2255-7.
82. Bollag G, Freeman S, Lyons JF, Post LE. Raf pathway inhibitors in oncology. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 Dec;4(12):1436-41.
83. Lee JT, McCubrey JA. BAY-43-9006 Bayer/Onyx. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 Jun;4(6):757-63.
84. Karasarides M, Chiloehes A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene*. 2004 Aug 19;23(37):6292-8.
85. Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, Waterhouse D, Hecht JR, Natale RB, et al. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Nov 15;22(22):4456-62.
86. Sebolt-Leopold JS. MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors. *Curr Pharm Des*. 2004;10(16):1907-14.
87. Fluge O, Bruland O, Akslen LA, Lillehaug JR, Varhaug JE. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2006 Feb;16(2):161-75.

88. Fluge O, Haugen DR, Akslen LA, Marstad A, Santoro M, Fusco A, et al. Expression and alternative splicing of c-ret RNA in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2001 Feb 15;20(7):885-92.
89. Mullen JR, Kayne PS, Moerschell RP, Tsunasawa S, Gribskov M, Colavito-Shepanski M, et al. Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *EMBO J*. 1989 Jul;8(7):2067-75.
90. Fluge O, Bruland O, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. NATH, a novel gene overexpressed in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2002 Aug 1;21(33):5056-68.