



ALINE CAROLINA DE NADAI DA SILVA

**ESTUDO DE UTILIDADE CLÍNICA DA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES
GÊNICAS NAS VIAS PI3K/AKT E MAPK NO DIAGNÓSTICO DO NÓDULO
TIROIDIANO E NA PREDIÇÃO DE EVOLUÇÃO DO PACIENTE COM CÂNCER
DIFERENCIADO DA TIROIDE**

***STUDY OF CLINICAL UTILITY IN THE IDENTIFICATION OF GENETIC
ALTERATIONS IN PI3K/AKT AND MAPK PATHWAYS IN DIAGNOSIS OF
THYROID NODULES AND IN PREDICTION OF OUTCOME IN PATIENTS WITH
DIFFERENTIATED THYROID CARCINOMA***

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ALINE CAROLINA DE NADAI DA SILVA

**ESTUDO DE UTILIDADE CLÍNICA DA IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES
GÊNICAS NA VIA PI3K/AKT E MAPK NO DIAGNÓSTICO DO NÓDULO
TIROIDIANO E NA PREDIÇÃO DE EVOLUÇÃO DO PACIENTE COM CÂNCER
DIFERENCIADO DA TIROIDE**

Orientadora: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio José da Silva

***STUDY OF CLINICAL UTILITY IN THE IDENTIFICATION OF GENETIC
ALTERATIONS IN PI3K/AKT AND MAPK PATHWAYS IN DIAGNOSIS OF
THYROID NODULES AND IN PREDICTION OF OUTCOME IN PATIENTS WITH
DIFFERENTIATED THYROID CARCINOMA***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

Master Dissertation presented to Clinical Medicine Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Clinical Medicine.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE CAROLINA DE NADAI DA SILVA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD.

Assinatura da orientadora

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si38e Silva, Aline Carolina De Nadai da, 1986-
Estudo de utilidade clínica da identificação de alterações gênicas na via PI3K/AKT e MAPK no diagnóstico do nódulo tireoidiano e na predição de evolução do paciente com câncer diferenciado da tiroide / Aline Carolina De Nadai da Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Laura Sterian Ward.
Coorientador : Márcio José da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da glândula tireóide. 2. Proliferação de células. 3. Mutação. I. Ward, Laura Sterian, 1956-. II. Silva, Marcio José da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of clinical utility in the identification of genetic alterations in PI3K/AKT and MAPK pathways in diagnosis of thyroid nodules and in prediction of outcome in patients with differentiated thyroid carcinoma.

Palavras-chave em inglês:

Thyroid neoplasms

Cell proliferation

Mutation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Antônio Hugo José Froes Marques Campos

Lígia Vera Montali da Assumpção

Data da defesa: 23-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Aline Carolina De Nadai da Silva

Orientador: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Membros:

1. Prof. Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos

2. Profa. Dra. Lígia Vera Montali Da Assumpção

3. Profa. Dra. Laura Sterian Ward

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

Data: 23/08/2012

Dedico esta dissertação aos meus pais Donizete e Valéria e ao meu irmão César pelo exemplo de amor e carinho, estando sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida e que foram os responsáveis pela realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por mais esta Graça alcançada em minha vida e que tenho sempre presente e em todos os momentos me guiando e me protegendo, pois sem Ele eu não teria conseguido realizar este trabalho.

À minha orientadora Dra Laura, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e ter confiado na minha capacidade desde o início. Sou a pesquisadora que sou hoje graças a minha mãe científica, a qual me proporcionou um aprendizado que levarei para o resto da minha vida.

Ao meu co-orientador Márcio, por ter me dado a oportunidade de realizar a técnica de sequenciamento no seu laboratório no CBMEG (Unicamp), me ensinando e ajudando na interpretação dos resultados.

Aos meu pais, Donizete e Valéria, que sempre me apoiaram nos meus estudos, me incentivam nos meus projetos futuros e são exemplos de superação na vida a serem seguidos. Vocês são tudo na minha vida, a base de toda a minha educação como pessoa só possuo graças a vocês, sem vocês eu não sou ninguém.

Ao meu irmão César que sempre está do meu lado quando preciso dele me dando apoio e aguentando os meus momentos de irritação.

Ao meu namorado Henrique que sempre esteve do meu lado, me apoiando e incentivando os meus estudos. Ele compartilhou comigo durante todo este tempo, dos momentos tristes e felizes, difíceis e gratificantes e sempre me ajuda a superar cada obstáculo que a vida nos oferece. Por isso, além de ser meu amor é meu companheiro de todas as horas.

As minhas avós Olga e Lourdes que sempre fazem orações pedindo a minha proteção a Deus e torcem pelo meu sucesso e minha felicidade.

Aos meus familiares que sempre torceram muito por mim e pelo meu sucesso, me ajudando através de orações e me incentivando na realização deste trabalho, pois sou a primeira pessoa da família que teve a oportunidade de obter um título de mestre.

Ao pessoal do GEMOCA, Angélica, Elaine, Fernando, Lucas, Jacqueline, Raquel, Rita, Mariana, Marjory, Natássia, Renata e Ulieme, sendo uma nova família que eu formei

e me proporcionou muitas risadas e aprendizado durante este tempo. Obrigada por ter me ajudado com as críticas e sugestões para melhoria deste trabalho.

À Natássia, que além de ser minha amiga, foi minha companheira de república e é a irmã que eu não tenho. Graças a você que me apresentou neste grupo de pesquisa e me ensinou sobre biologia molecular foi que consegui realizar este trabalho.

À Elaine, por ter me aceitado para fazer o estágio no GEMOCA sendo a bióloga responsável na época e por ter apresentado ao pessoal do Hospital AC Camargo, sendo o local que forneceu as amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Fábio Conte por ter me apresentado ao Márcio do CBMEG e assim ter conseguido desenvolver uma parte deste trabalho. Além de ter me ensinado muito sobre genética e me ajudado com os resultados de sequenciamento.

À Daniela, funcionária do CBMEG, que preparou todas as placas de sequenciamento e sempre foi prestativa para me ajudar.

Ao Hospital do Câncer AC Camargo de São Paulo, por ter estabelecido uma parceria de trabalho que nos forneceu as amostras de DNA de tecido tumoral para a realização deste trabalho.

À Eloisa, do Laboratório de Macromoléculas do Hospital AC Camargo que fez a extração de DNA de todas as amostras utilizadas neste trabalho.

À Bianca, funcionária do Hospital AC Camargo que me apresentou e ensinou sobre o software utilizado na leitura do sequenciamento automático.

Às agências de fomento Capes e FAPESP pelo fundamental apoio para realização deste trabalho.

"Apesar dos nossos defeitos,
precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da
vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas
fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus
sonhos ou desistem deles."

Autor: Augusto Cury

Livro: Nunca desista dos seus sonhos

RESUMO

O câncer diferenciado de tireoide (CDT) é a malignidade endócrina mais comum e a quarta mais frequente entre as mulheres Brasileiras. O carcinoma papilífero da tireoide (CPT) representa 80-90% de todas as malignidades tireoidianas. As mais importantes vias envolvidas na formação e progressão do CDT são as vias MAPK e PI3K/AKT. O gene *RAS* possui como uma de suas vias efectoras a via PI3K/AKT, a qual tem um papel importante na sobrevivência e na proliferação celular. A mutação Q61R do gene *NRAS* é a mais frequentemente encontrada em CDT. O gene *BRAF* possui mutações pontuais que são identificadas em 40-45% nos CPT, sendo a V600E a mais comum encontrada nesta neoplasia e responsável por manter e promover a progressão a tumores mais agressivos do CPT. O gene *AKT* possui um papel importante na via de sinalização PI3K, regulando a sobrevivência, proliferação e crescimento celular, sendo que a isoforma *AKT1* possui um papel de pró-motilidade em CDT. Para investigar a utilidade clínica das vias MAPK e PI3K/AKT no diagnóstico e prognóstico do CDT foi realizada a genotipagem da mutação dos genes *NRAS*, *HRAS* e *BRAF* e o sequenciamento automático do éxon 3 do gene *AKT1* em 281 pacientes com nódulos tireoidianos. Destes, 190 eram tumores benignos, incluindo 121 hiperplasias e 69 adenomas foliculares, e 91 eram tumores malignos, sendo 60 carcinomas papilíferos variante clássica, 26 carcinomas papilíferos variante folicular, 01 carcinoma papilífero variante células altas, 02 carcinomas foliculares e 02 carcinomas anaplásicos. Todos os pacientes foram tratados e seguidos de acordo com um protocolo padrão por 12 a 87 meses ($38,06 \pm 19,9$ meses). A genotipagem do códon 61 do gene *NRAS* mostrou que indivíduos com genótipo CT possuem maior risco de desenvolverem o CPT de variante folicular ($p=0,025$). Já a mutação de *HRAS* não teve nenhuma utilidade clínica. A presença do genótipo heterozigoto da mutação de *BRAF* teve associação com o desenvolvimento do CPT ($p<0,001$). Observamos alterações genéticas no éxon 3 do gene *AKT1* em 114 (41,76%) de 273 pacientes. Foram encontradas 3 alterações intrônicas (rs2494738, rs3730368, rs3730358) e uma exônica (L52R). A presença da alteração rs2494738 mostrou associação com ausência de invasão tumoral ($p=0,004$) e a rs3730368 como fator de proteção no desenvolvimento de tumores malignos ($p=0,046$), enquanto que o genótipo selvagem se relacionou com o desenvolvimento de tumores benignos menores

de 2cm ($p=0,033$). A presença da alteração rs3730358 se associou com tumores malignos menores de 2 cm ($p=0,032$). Já a presença da alteração L52R apareceu em tumores malignos ($p=0,004$) e encapsulados ($p=0,006$), em tumores benignos menores de 2cm ($p=0,029$) e de 2-4cm ($p=0,0387$). Portanto, podemos concluir que existem alterações genéticas importantes que possam influenciar no desenvolvimento do CDT, sugerindo que estas alterações possam servir como possíveis marcadores de diagnóstico. Porém neste estudo estas alterações não tiveram relação com prognóstico, talvez pelo baixo tempo de seguimento destes pacientes.

ABSTRACT

Differentiated thyroid cancer (DTC) is the most common endocrine malignancy and the fourth most frequent among Brazilian women. Papillary thyroid carcinoma (PTC) represents 80-90% of all thyroid malignancies. The most important pathways involved in the formation and progression of DTC are the MAPK and PI3K/AKT pathways. The *RAS* gene has as one of its effectors the PI3K/AKT pathway, which plays an important role in the survival and proliferation. The mutation Q61R of *NRAS* gene is most often found in DTC. The *BRAF* gene mutations that have been identified in 40-45% in the CPT, and the V600E found this the most common malignancy and is responsible for maintaining and promoting the progression to more aggressive tumors of the PTC. The *AKT* gene has a role in signaling fosfotidilinositol-3 kinase (PI3K) pathway regulating the survival, proliferation and cell growth, and the *AKT1* isoform plays a pro-motility in DTC. To investigate the clinical utility of the MAPK and PI3K/AKT pathways in the diagnosis and prognosis of DTC was performed by genotyping of the mutations of *NRAS*, *HRAS* and *BRAF* genes and sequencing of exon 3 of the *AKT1* gene in 281 patients with thyroid nodule. Of these, 190 were benign, including 121 hyperplasias and 69 follicular adenomas, and 91 were malignant tumors, including 60 classic variant papillary carcinomas, 26 follicular variant papillary carcinomas, 01 tall cell variant of papillary carcinoma, 02 follicular carcinomas and 02 anaplastic carcinomas. All patients were treated and followed according to a standard protocol for 12 to 87 months (38.06 ± 19.9 months). Genotyping of codon 61 of *NRAS* gene showed that patients with CT genotype have increased risk of PTC developed the follicular variant ($p=0.025$). Already *HRAS* mutation had no clinical utility. The presence of the heterozygous genotype of the *BRAF* mutation was associated with the development of PTC ($p < 0.001$). We observed genetic alterations in exon 3 of the *AKT1* gene in 114 (41.76%) of 273 patients. We found three intronic changes (rs2494738, rs3730368, rs3730358) and one exonic (L52R). The genetic alteration rs2494738 showed no association with tumor invasion ($p=0,004$) and the rs3730368 as a protective factor in the development of malignant tumors ($p=0,046$), whereas the wildtype genotype associated with benign tumors smaller than 2 cm ($p=0,033$). The presence of the alteration rs3730358 was associated with malignant tumors smaller than 2 cm ($p=0,032$). The presence of the

alteration L52R appeared in malignant tumors ($p=0,004$) and encapsulated ($p=0,006$), and in benign tumors smaller than 2 cm ($p=0,029$) and 2-4cm ($p=0,0387$). Therefore, we conclude that there are important genetic alterations that may influence the development of the CDT, suggesting that these changes may serve as potential diagnostic markers, but in this study these changes did not correlate with prognosis perhaps by the low follow-up of these patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

95%IC	Coeficiente de Intervalo de Confiança de 95%
AF	Adenoma Folicular
AKT	Do inglês: <i>murine thymoma viral oncogene homolog</i>
AKT1	Do inglês: <i>murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AKT2	Do inglês: <i>murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
ATA	Do inglês: <i>American Thyroid Association</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BRAF	Do inglês: <i>v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
CAT	Carcinoma Anaplásico da Tireoide
CCH	Carcinoma de células de Hurthle
CDT	Carcinoma Diferenciado da Tireoide
CFT	Carcinoma Folicular da Tireoide
CPT	Carcinoma Papilífero da Tireoide
CPVF	Carcinoma Papilífero Variante Folicular
DNA	Ácido desoxiribonucléico
F	Teste Exato de Fisher
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GEMOCA	Laboratório de Genética Molecular do Câncer
HRAS	Do inglês: <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KRAS	Do inglês: <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LATS	Do inglês: <i>Latin American Thyroid Association</i>
MAPK	Ativação mitogênica da proteína quinase, do inglês: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
NRAS	Do inglês: <i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NTRK1	Do inglês: <i>neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1</i>
OR	Odds Ratio
p - value	Valor de p

PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDK-1	Fosfotidíseo dependente kinase-1, do inglês: <i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PDK-2	Fosfotidíseo dependente kinase-2, do inglês: <i>Phosphoinositide-dependent kinase-2</i>
PH	Homólogo Pleckstrin, do inglês: <i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	Fosfotidilinositol-3-kinase
PI3KCA	Fosfotidilinositol-3-kinase classe A
PIP2	Fosfotidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfotidilinositol trifosfato
PKB	Proteína kinase B
PKB α	Proteína kinase B alfa
PKB β	Proteína kinase B beta
PKB γ	Proteína kinase B gama
RAS	Do inglês: <i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RET	Proto-oncogene RET
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SAS	Sistema de Análise Estatística; do inglês: <i>Statistical Analyses System</i>
SNP	Polimorfismo de Base Única; do inglês: <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
T4L	Tiroxina Livre
Tg	Tireoglobulina
TRK	Receptor tirosina kinase, do inglês: <i>thyroid receptor kinase</i>
TSH	Hormônio Tiroestimulante; do inglês: <i>Thyroid-stimulating Hormone</i>
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultra-violeta
x ²	Qui-Quadrado

LISTA DE TABELAS

		<i>PÁG.</i>
Tabela 1	Genes estudados com suas respectivas sondas	40
Tabela 2	Primer utilizado para amplificação dos fragmentos do éxon 3 do gene <i>AKT1</i>	43
Tabela 3	Relação entre grupo benigno e maligno quanto a características como sexo e etnia	47
Tabela 4	Distribuição dos genótipos da mutação Q61R do gene <i>NRAS</i> entre o grupo benigno e maligno	48
Tabela 5	Resultados estatísticos das características clínico-patológicas das amostras genotipadas da mutação Q61R do gene <i>NRAS</i>	49
Tabela 6	Distribuição dos genótipos da mutação Q61K do gene <i>HRAS</i> entre o grupo benigno e maligno	51
Tabela 7	Distribuição dos genótipos da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> entre o grupo benigno e maligno	52
Tabela 8	Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à mutação V600E do gene <i>BRAF</i>	53
Tabela 9	Distribuição dos genótipos obtidos para a alteração rs2494738 do gene <i>AKT1</i> entre o grupo benigno e maligno	55
Tabela 10	Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à alteração na região intrônica (rs2494738) do gene <i>AKT1</i>	56
Tabela 11	Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à alteração rs3730368 do gene <i>AKT1</i> entre o grupo benigno e maligno	58
Tabela 12	Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à alteração na região intrônica (rs3730368) do gene <i>AKT1</i>	59
Tabela 13	Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à alteração rs3730358 do gene <i>AKT1</i> entre o grupo benigno e maligno	60
Tabela 14	Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à alteração rs3730358 do gene <i>AKT1</i>	61
Tabela 15	Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à	63

alteração L52R do gene *AKT1* entre o grupo benigno e maligno

Tabela 16	Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à alteração na região exônica (L52R) do gene <i>AKT1</i>	64
------------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

		<i>PÁG.</i>
Figura 1	Estimativa de incidência dos tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma. Modificado a partir dos dados do INCA, 2012	25
Figura 2	Imagem adaptada da referencia 17, a qual demonstra o processo de desdiferenciação da célula folicular tireoidiana	26
Figura 3	As principais vias de sinalização que envolvem a carcinogênese tireoidiana.	28
Figura 4	Imagem adaptada de Livak e colaboradores mostrando o esquema de ligações entre o alvo e sequências de sonda pela técnica TaqMan. (a) : Ligação apenas da sonda VIC indicando o genótipo homozigoto. (b) : Ligação da sonda FAM, indicando também o genótipo homozigoto. (c) : Ligação da sonda VIC e da sonda FAM indicando o genótipo heterozigoto.	39
Figura 5	Resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. A curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto selvagem.	41
Figura 6	Resultado da técnica <i>TaqMan® SNP Genotyping</i> na qual a curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto mutado.	41
Figura 7	Resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. As curvas indicam que o indivíduo apresenta o genótipo heterozigoto.	42
Figura 8	Resumo dos resultados da técnica <i>TaqMan® SNP Genotyping</i> . Em azul estão respresentadas as amostras que são homozigotos para o alelo T; em verde, as amostras são heterozigotas; em vermelho, as amostras são homozigotas para o alelo C; e em preto, as amostras não foram identificadas.	42
Figura 9	Resultado da PCR do éxon 3 do gene <i>AKT1</i> em gel de agarose corado com GelRed TM Nucleic Acid Stain. 1: Ladder de 100pb; 2-	44

7: banda de 320pb do éxon 3 de *AKT1* presente; 8: controle negativo.

Figura 10 Exemplo de análise de sequência gênica usando software para interpretação do sequenciamento do gene *AKT1* éxon 3 45

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1 Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da mutação Q61R de <i>NRAS</i>	50
Gráfico 2 Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da mutação V600E de <i>BRAF</i>	54
Gráfico 3 Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da alteração rs2494738 encontrada no éxon 3 do gene <i>AKT1</i>	57
Gráfico 4 Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da alteração rs3730358 encontrada no éxon 3 do gene <i>AKT1</i>	62
Gráfico 5 Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da alteração L52R encontrada no éxon 3 do gene <i>AKT1</i>	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Doenças tiroidianas nodulares	23
1.2	Câncer de tireoide	24
1.3	Via de sinalização PI3K/AKT e MAPK	27
1.4	Gene <i>RAS</i>	28
1.5	Gene <i>BRAF</i>	29
1.6	Gene <i>AKT</i>	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Geral	34
2.2	Específico	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Casuística	36
3.1.1	Pacientes com Carcinoma Diferenciado da Tireoide	36
3.1.2	Seguimento	37
3.2	Metodologias	38
3.2.1	Extração de DNA	38
3.2.2	Análise dos genes <i>NRAS</i> , <i>HRAS</i> e <i>BRAF</i>	38
3.2.3	Análise do gene <i>AKT1</i>	43
3.2.4	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Análise descritiva dos pacientes	47
4.2	Resultados para a mutação Q61R do gene <i>NRAS</i>	48
4.2.1	Análise diagnóstica	48
4.2.2	Análise prognóstica	50

4.3 Resultados para a mutação Q61K do gene <i>HRAS</i>	51
4.4 Resultados para a mutação V600E do gene <i>BRAF</i>	52
4.4.1 Análise diagnóstica	52
4.4.2 Análise prognóstica	54
4.5 Resultados para o gene <i>AKT1</i> éxon 3	54
4.5.1 Resultados para a alteração <i>AKT1</i> rs 2494738	55
4.5.1.1 Análise diagnóstica	55
4.5.1.2 Análise prognóstica	56
4.5.2 Resultados para a alteração <i>AKT1</i> rs3730368	57
4.5.2.1 Análise diagnóstica	57
4.5.3 Resultados para a alteração <i>AKT1</i> rs 3730358	59
4.5.3.1 Análise diagnóstica	59
4.5.3.1 Análise prognóstica	60
4.5.4 Resultados para a alteração <i>AKT1</i> L52R	62
4.5.4.1 Análise diagnóstica	62
4.5.4.2 Análise prognóstica	64
5 RESUMO DOS ACHADOS	66
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS	76
9 ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

A glândula tireoide é importante para o corpo humano devido a sua habilidade em produzir os hormônios necessários para manter os níveis de energia apropriados e a vida ativa. Tais hormônios possuem efeitos pleiotrópicos, desempenham um papel crítico no início do desenvolvimento cerebral, crescimento somático, maturação óssea e síntese de RNAm de mais de 100 proteínas que regulam cada função corporal (1).

As doenças da tireoide possuem elevada prevalência e se manifestam por meio de disfunção hormonal, seja por excesso ou por deficiência de produção hormonal, ou por alterações anatômicas decorrentes do crescimento difuso ou nodular da glândula (2).

1.1 Doenças tiroidianas nodulares

Nódulos tiroidianos são detectados pelo seu tamanho, posição cervical ou ainda pela habilidade que o médico apresenta ao realizar o exame palpatório. No entanto, a maioria dos nódulos da tireoide não são clinicamente reconhecidos. A ultrassonografia, como ferramenta de triagem, é muito sensível, mas poderá resultar em preocupação desnecessária, já que os nódulos são tão comuns que raramente apresentam significado patológico. Porém, a sua utilização pode identificar se os pacientes apresentam nódulos simples ou múltiplos, suas dimensões e características. Como as técnicas de diagnóstico de nódulos de tireoide têm se tornado mais sensíveis e cada vez mais acessíveis à população em geral, tem havido um aumento paralelo da detecção do carcinoma diferenciado da tireoide (CDT) (3).

De fato, a prevalência de nódulos tiroidianos varia de acordo com o método de rastreamento utilizado, passando de cerca de 1% nos homens e 5% das mulheres que vivem em condições de suficiência de iodo quando o diagnóstico é apenas clínico (4-7), para 76% quando se utiliza métodos de imagem como a ultrassonografia (7).

Além do uso de práticas de diagnóstico sensíveis, o aumento da detecção de nódulos da tireoide também é determinado pela associação de inúmeros fatores de risco como idade, sexo, etnia, localização geográfica e exposição a fatores ambientais (3, 8).

1.2 Câncer de tireoide

O câncer diferenciado de tireoide (CDT) é a malignidade endócrina mais comum, com uma estimativa de aproximadamente 45 mil novos casos diagnosticados nos Estados Unidos em 2012 (9). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CDT é o câncer mais comum de cabeça e pescoço no Brasil, sendo três vezes mais frequente no sexo feminino (INCA, 2012). O INCA estima que o câncer de tireoide tenha sido responsável por 12,9% de todas as neoplasias registradas no sexo feminino e por 3,2% das neoplasias do sexo masculino em 2009 (INCA, 2012). Além disso, são esperados 10.590 casos novos de câncer da tireoide em 2012, com um risco estimado de 11 casos a cada 100 mil mulheres, projetando-se o CDT como o quarto mais frequente entre mulheres no ano de 2012, como mostrado na figura 1 (INCA, 2012).

Brito e colaboradores (2011) estimam que houve 6.066 novos casos de CDT no ano de 2006, 1.065 casos acometendo o sexo masculino e 5.001 casos no sexo feminino. A taxa de incidência foi de 1,16 e 5,27, respectivamente, para cada 100.000 habitantes. Além disso, em ambos os sexos houve um aumento na incidência com relação a idade, particularmente a partir dos 30 anos de idade, e este aumento foi maior entre as mulheres do que nos homens (10).

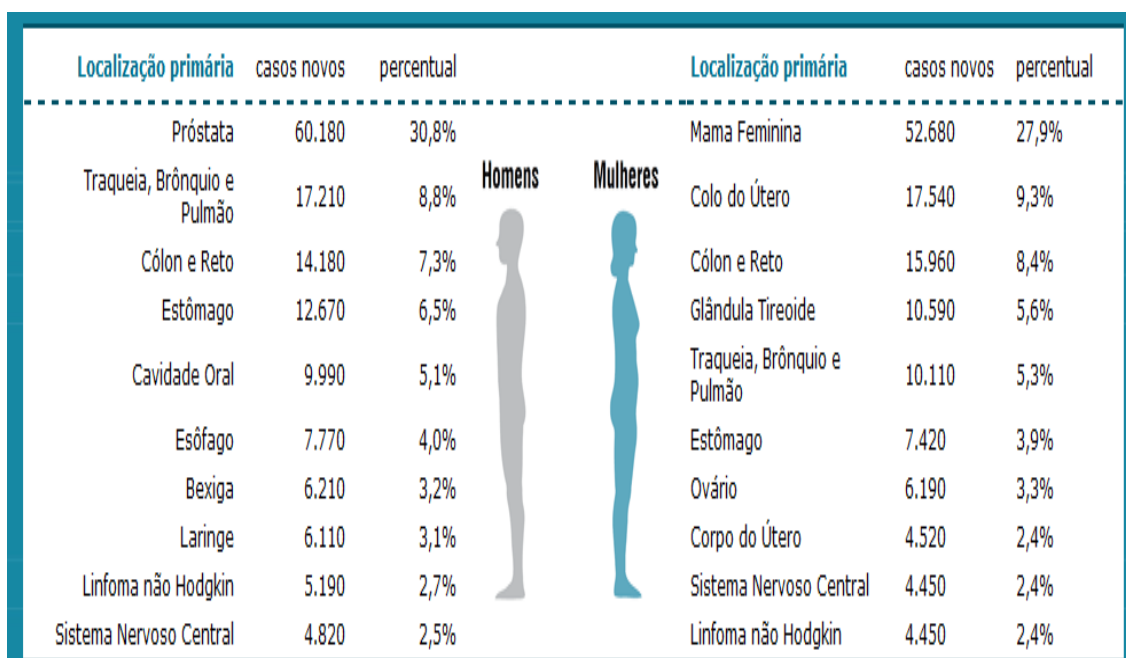


Figura 1. Estimativa de incidência dos tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma. Modificado a partir dos dados do INCA, 2012 (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>).

Os cânceres originados a partir das células foliculares são subdivididos em carcinomas papilíferos da tireoide (CPT, cerca de 80% de todos os CDT) e carcinomas foliculares da tireoide (CFT, cerca de 5% de todos os CDT). Existem ainda os carcinomas pouco diferenciados (cerca de 5-10% de todos os cânceres da tireoide), os carcinomas de células de Hurthle (CCH, cerca de 3% de todos os cânceres da tireoide) e, por fim, o carcinoma anaplásico da tireoide (CAT, cerca de 1% de todos os cânceres da tireoide) também chamado de carcinoma indiferenciado da tireoide (11).

O adenoma folicular (AF) é um tumor benigno que pode servir como um precursor para carcinomas foliculares. Os cânceres menos diferenciados da tireoide, denominados como carcinoma pouco diferenciado e o indiferenciado (carcinoma anaplásico), desenvolvem-se através do processo de desdiferenciação gradual dos carcinomas papilares e foliculares ou podem originar-se independentemente deste processo como demonstrado na figura 2 (12).

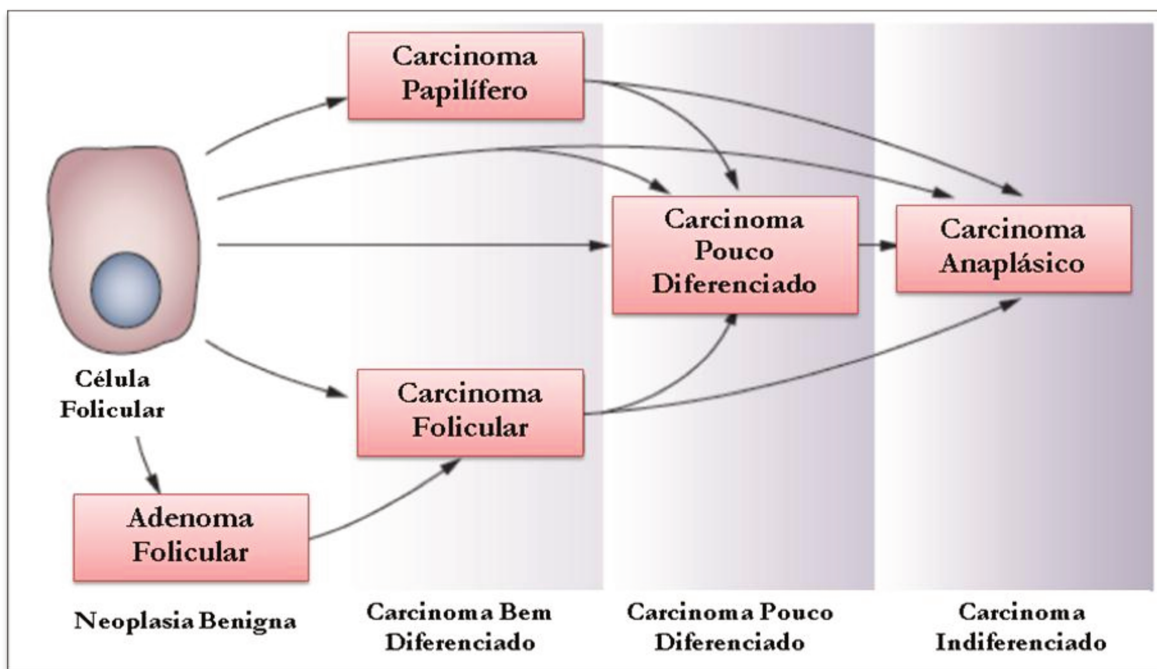


Figura 2. Imagem adaptada da referência 17, a qual demonstra o processo de desdiferenciação da célula folicular tireoidiana.

As células foliculares das quais são derivadas o CPT e o CFT são semelhantes estrutural e funcionalmente às células tireoidianas normais, apresentando boa evolução clínica após cirurgia e ao radioiodo. Essas características podem, entretanto, complicar o diagnóstico, fazendo com que estas lesões sejam consideradas como “indeterminadas” ou Bethesda classes 3 ou 4 (13).

De 20 a 30% dos nódulos, submetidos à punção aspirativa por agulha fina (PAAF), possuem histologia “indeterminada”, um padrão que se manteve praticamente inalterado ao longo das últimas duas décadas (14-18). Todos esses pacientes são, atualmente, encaminhados à cirurgia para definir a citologia dos nódulos (19), sendo que em sua grande maioria, revela-se desnecessária para 70% destes pacientes cujas lesões serão histologicamente benignas (20).

Além disso, a tendência ascendente na incidência de CDT em todo o mundo deve-se principalmente a microcarcinomas papilíferos, cujo significado clínico ainda é incerto e que, em grande parte, não devem evoluir clinicamente, o que podem explicar, pelo menos em parte, a baixa mortalidade por CDT (21). Por outro lado, 5-15% do CDTs evoluem com

recidivas, que podem tornar-se insensíveis à terapia com radioiodo e, eventualmente, colaborar para os registros de óbitos pela doença (22).

Uma série de sistemas de classificação baseados em características clínicas, patológicas e moleculares são utilizados para prever o prognóstico e orientar as estratégias de tratamento cirúrgico e clínico. Alguns marcadores moleculares, como o gene *BRAF*, parecem muito promissores no entendimento da progressão tumoral (23).

Atualmente, esses marcadores ainda não são fortes o suficiente para prever a necessidade de tratamento mais agressivo (19). Com isso, novos marcadores de diagnóstico são necessários, em particular para as lesões de padrão folicular, que na maior parte dos casos se revelam como condições benignas que poderiam não ser submetidas à cirurgia, como a hiperplasia e o adenoma folicular (19). No entanto, novos marcadores de prognóstico poderiam auxiliar no delineamento estratégico da cirurgia e no seguimento destes pacientes.

1.3 Via de sinalização PI3K/AKT e MAPK

Assim como em outros cânceres, a iniciação e a progressão do CDT ocorre através do acúmulo gradual de várias alterações genéticas e epigenéticas, incluindo a presença de mutações somáticas, alteração na expressão de genes, desregulação de microRNA e aumento de metilação de alguns genes. A maioria dos estudos refere-se a mutações somáticas como as mais frequentes, muitas das quais ocorrem no início do processo de transformação e são essenciais para o desenvolvimento do câncer (12). No entanto, nas últimas décadas vem aparecendo evidências do papel da via PI3K/AKT e da MAPK não apenas na formação mas também na progressão do CDT (24-28).

A ativação da via de sinalização MAPK é crucial para a formação inicial do tumor. Os genes que compõem esta via codificam receptores de membrana celular tirosina kinase (*RET* e *NTRK1*) e proteínas transdutoras de sinais (*RAS* e *BRAF*) (12).

No CPT são encontradas mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS*, bem como em rearranjos genéticos de *RET/PTC* e *TRK*, sendo todos estes genes ativados pela via de sinalização mitogênica proteína kinase (MAPK). Estas mutações são identificadas em mais de 70% dos CPT (29-32).

A progressão e a desdiferenciação do CDT envolvem um número adicional de mutações que afetam a via PI3K/AKT. Dentre os genes que compoem esta via, encontram-se *PI3KCA* e *AKT1* (12).

Muitas das mutações que ocorrem no CDT envolvem os efetores das via MAPK e da via PI3K/AKT como demonstrado na figura 3.

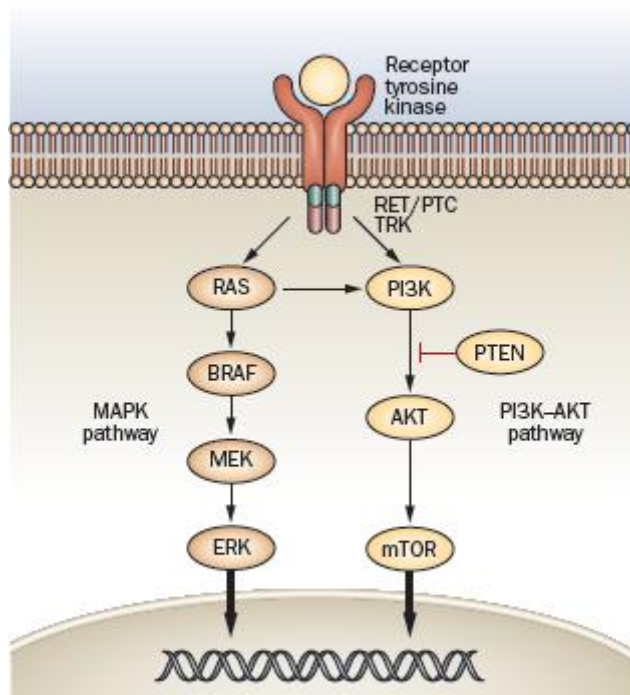


Figura 3. As principais vias de sinalização que envolvem a carcinogênese tireoidiana (12)

1.4 Gene *RAS*

A família *RAS* (*HRAS*, *NRAS* e *KRAS*) codifica uma família de enzimas GTPases que são altamente preservadas entre as espécies. Desempenham um papel fundamental em diversas funções celulares básicas, incluindo o controle da proliferação, diferenciação e apoptose (33-36).

A ativação fisiológica e oncogênica do gene *RAS* estimula uma grande variedade de vias de sinalização subsequentes (*downstream*). A primeira via de sinalização efetora descrita é a via RAF-MEK-ERK (33-36). Esta via é essencial, pois é composta de um elemento comum de sinalização mitogênica envolvendo receptores tirosina quinase que

determina uma grande variedade de respostas celulares (37). A segunda mais importante via efetora de *RAS* é a família das enzimas fosfatidilinositol-3-kinases (PI3Ks), que também desempenha um papel importante na mediação da sobrevivência e na proliferação celular (38).

Os genes da família *RAS* codificam proteínas G intracelulares que propagam sinais dos receptores celulares tirosina kinase e G-acoplados para as vias de sinalização MAPK, PI3K/AKT e para outras vias. Mutações pontuais no gene *RAS* são comuns em tumores humanos: a mutação no gene *KRAS* códons 12 e 13 é frequente em muitos cânceres, enquanto que as mutações no gene *NRAS* códon 61 e *HRAS* códon 61 são mais frequentemente encontrados em tumores tiroidianos. Mutações no gene *RAS* ocorrem em todas as malignidades tiroidianas epiteliais, sendo identificadas em 40-50% dos CFT (39-44), 20-40% dos adenomas foliculares (40, 43-46) e em 10-20% dos CPT (39, 46-50).

Desta maneira são encontradas mutações no gene *RAS* tanto nos tumores benignos quanto nos malignos da tiroide, sugerindo que tais mutações ocorram em estágio inicial da transformação oncogenética da célula folicular. Com isso, faz-se necessário novos estudos em pacientes com CDT a fim de diferenciar os tipos histológicos e determinar marcadores de diagnóstico e de prognóstico através da análise destas mutações.

1.5 Gene *BRAF*

Mutações pontuais no protooncogene RAF tipo-B (*BRAF*) são identificadas em 40-45% dos CPT e são as alterações moleculares mais comumente encontradas nesta neoplasia (31, 51).

BRAF é uma serina-treonina kinase pertencente a família de proteínas kinase RAF que inclui efetores intracelulares da via de sinalização MAPK. Estas mutações em *BRAF* geralmente envolvem o nucleotídeo localizado na posição 1799, e resultam na substituição do aminoácido valina por uma glutamina no códon 600 (V600E) (52-53). A presença da mutação V600E não somente inicia o processo tumorigênico nas células tiroidianas foliculares normais, como também é responsável por manter e promover a progressão da neoplasia a tumores mais agressivos do CPT (54-55).

Esta mutação está sendo relacionada como promissora no prognóstico do CPT, podendo ser investigada através de amostras resultantes do exame de PAAF pré-operatória (23).

Apesar da identificação da mutação de *BRAF* ter sido utilizada no diagnóstico (56-57) e também na predição de evolução dos pacientes com CDT, já havendo ampla literatura a respeito de sua utilidade clínica (58-60), ainda há necessidade de novos estudos que comprovem sua eficácia quanto a sua utilidade como marcador de diagnóstico e de prognóstico já que esta mutação está associada com alterações morfológicas e funcionais características do fenótipo do CPT. Além disso, ainda há controvérsias quanto a sua significância clínica como marcador de prognóstico, pois diversos autores relataram que esta mutação não está relacionada com pior prognóstico e com características de agressividade (61-63).

1.6 Gene *AKT*

AKT, também conhecido como proteína kinase B (PKB), é uma serina/treonina kinase originalmente identificada como homólogo humano do oncogene viral v-akt e possui três isoformas: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) e AKT3 (PKB γ). AKT possui um papel importante na via de sinalização fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K), regulando a sobrevivência, proliferação e crescimento celular (38, 64-65).

As três isoformas de AKT tem sido identificadas em células de mamíferos, e cada uma é transcrita em genes separados. Todas estas isoformas possuem a mesma forma estrutural, mas são distribuídas diferentemente nos tecidos. Em condições fisiológicas, AKT1 e AKT2 parecem estar juntamente expressas, enquanto que AKT3 é expresso preferencialmente no coração, fígado, cérebro, testículos, pulmão e músculo esquelético (6).

AKT possui um domínio pleckstrina (PH- pleckstrin homology), um sítio de ligação ATP e dois sítios de fosforilação. O domínio PH de *AKT* se liga aos compostos produzidos por *PI3KCA* (PIP2 e PIP3), levando ao recrutamento de *AKT* na membrana plasmática (66-67). O primeiro sítio de fosforilação de *AKT1*, o Treonina 308, é fosforilado pela proteína PDK-1, enquanto que o segundo sítio da mesma isoforma, o Serina 473, pode

ser fosforilado por outras kinases com a atividade de PDK-2, assim como a integrina kinase acoplada, a kinase DNA-dependente, a proteína kinase C e o complexo TORC2, podem ser autofosforilados, resultando em uma máxima ativação kinase (68-73). Desta maneira, *AKT* fosforila uma variedade de genes *downstream* no citoplasma (74). Esta fosforilação tem sido relacionada com um aumento na proliferação celular, motilidade, síntese protéica e gluconeogênese assim como a inibição a apoptose (75).

Em células tiroidianas normais todas as isoformas de AKT são expressas, mas AKT1 possui maiores níveis de RNA mensageiro e proteína (27). Além disso, AKT1 parece ser a principal isoforma com elevada expressão e ativação em câncer de tireoide quando comparada com tecidos normais. Com isso, sugere-se que a ativação desta isoforma esteja associada com invasão tumoral e metástase em carcinoma papilíferos e foliculares (76-77).

O gene *AKT1*, localizado no braço longo do cromossomo 14 na posição 32.32, possui um papel de pró-motilidade em câncer de tireoide, cólon e em células de melanoma *in vitro* (77-78). Em câncer de tireoide, a ativação de *AKT* ocorre com maior frequência nos CFT e pouco diferenciados do que nos CPT, porém foi encontrada em todos os subtipos histológicos (76, 79-84). Além disso, também têm sido demonstrado que níveis elevados de AKT1 fosforilado ocorrem em tumores tiroidianos primários agressivos que apresentam invasão tumoral (77).

Ricarte-Filho e colaboradores (2009) demonstraram mutações no domínio PH de AKT1 em tecidos tumorais tiroidianos metastáticos de pacientes que tiveram recorrência e que não respondem às terapias utilizadas para CDT (85).

A mutação pontual mais comumente encontrada no gene *AKT1* é a E17K, que está localizada no domínio homólogo pleckstrina. Esta mutação foi identificada em diversos cânceres, como câncer de mama (8%), cólon retal (6%) e ovário (2%) (86).

Existem poucos trabalhos na literatura que demonstram evidências de que as mutações da via PI3K/AKT possam ser eventos oncogênicos suficientes para ativar particularmente esta via de sinalização (11, 87-89). Por outro lado, a literatura sugere que o gene *AKT1* possui um papel importante na progressão do CDT (89), demonstrando assim a necessidade de realizar novos estudos a fim de identificar as alterações genéticas que

ocorrem neste gene e sua possível utilidade clínica como um marcador de diagnóstico e de prognóstico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar genes que pertencem às vias MAPK e PI3K/AKT em pacientes com nódulo tiroidiano para investigar sua utilidade clínica como possíveis marcadores de diagnóstico e prognóstico.

2.2 Específico

- 2.2.1 Verificar se a presença de mutações dos genes *BRAF* V600E, *NRAS* Q61R e *HRAS* Q61K auxilia no diagnóstico de malignidade em nódulos tiroidianos.
- 2.2.2 Verificar se a presença de mutações dos genes *BRAF* V600E, *NRAS* Q61R e *HRAS* Q61K se associa com características clínico-patológica dos pacientes com CDT.
- 2.2.3 Verificar se existem alterações genéticas no éxon 3 do gene *AKT1* em pacientes com CDT
- 2.2.4 Verificar se alterações genéticas no éxon 3 do gene *AKT1* possuem relação com característica clínico-patológica dos pacientes com CDT

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta é uma análise retrospectiva de caso-controle de pacientes com nódulos tireoidianos que foram atendidos no Hospital AC Camargo no período de 1991 a 2011. As análises abaixo descritas no item Metodologias foram todas realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Laboratório de Extração de Macromoléculas no Hospital AC Camargo de São Paulo.

3.1 Casuística

Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Informado conforme as determinações dos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo e da FCM/UNICAMP que aprovaram esta linha desta pesquisa (pareceres #09/09/10 - 1426/10 (anexo 1) e #27/01/10 - 961/2009 (anexo 2), respectivamente).

3.1.1 Pacientes com Carcinoma Diferenciado da Tireoide

Foram incluídos neste estudo indivíduos que tiveram nódulo tireoidiano primário. Estes pacientes seguiram um protocolo-padrão implantado no serviço que inclui uma ficha na qual constam, além de dados de identificação, idade no diagnóstico, sexo, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos, exposição a agentes ambientais, dieta, tabagismo, uso de medicamentos e drogas, exames realizados (ultrassom, pesquisa de corpo inteiro com iodo¹³¹, biópsia aspirativa), dados referentes à cirurgia e do exame anatomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação e presença de linfonodos metastáticos). Todos estes dados foram anotados em uma ficha (anexo 3) individual para cada paciente a partir da revisão dos prontuários médicos.

A população estudada foi composta por 281 pacientes com nódulos tireoidianos, sendo 233 mulheres e 48 homens, com média de idade de 46,84±14,41 anos. Destes nódulos, 190 eram benignos, incluindo 121 bóciós e 69 adenomas foliculares; e 91 eram tumores malignos, sendo 60 carcinomas papilíferos variante clássica, 26 carcinomas papilíferos variante folicular, 01 carcinoma papilífero variante células altas; 02 carcinomas

foliculares e 02 carcinomas anaplásicos. Todos os casos foram selecionados após o resultado do exame anatomopatológico e confirmados por experientes patologistas (Profs Drs Fernando Augusto Soares e José Vassallo- Hospital AC Camargo e FCM/UNICAMP).

Nenhum dos pacientes possuía histórico de exposição acidental ou médica à radiação ionizante ou de doença tireoidiana prévia e antecedentes de outras malignidades. Todos os dados, incluindo o diagnóstico de outras doenças concomitantes, foram confirmados nos prontuários dos pacientes.

3.1.2 Seguimento

Os pacientes com câncer foram submetidos a um mesmo protocolo de rotina que inclui tireoidectomia total e exploração intra-cirúrgica de cadeias ganglionares sempre que há suspeita ultrassonográfica ou clínica de acometimento linfonodal, de acordo com as diretrizes da ATA e LATS (90-91). Os pacientes foram, em seguida à cirurgia, submetidos a pesquisa de corpo inteiro com ^{131}I , e a dosagens periódicas de TSH sérico e de tiroglobulina (Tg). O protocolo de seguimento incluiu Raio-X, ultrassonografia, tomografia computadorizada e outros procedimentos para detectar metástase à distância, de acordo com cada caso. O período de seguimento foi de 12 a 87 meses ($38,06 \pm 19,9$ meses). Pacientes com altos valores de Tg (>2 ng/dL e/ou valores de Tg em elevação) e/ou pesquisas de corpo inteiro suspeitas foram submetidos a uma busca através de exames de imagens. Os pacientes foram definidos como recorrentes e/ou apresentando metástases à distância a partir da identificação de lesões nos exames de imagem e/ou da persistência de concentrações séricas de Tg >2 ng/dL ou de valores ascendentes de Tg. Foram considerados pacientes assintomáticos e livres de doença aqueles que apresentavam Tg <2 ng/dL.

Utilizou-se como critério para estadiamento da doença a classificação proposta por Sobin & Wittekind (2002) (92), que baseia-se no clássico método TNM, isto é, tamanho do tumor (T), acometimento de linfonodos cervicais (N) e metástases à distância (M).

Em relação a evolução dos pacientes com CDT, foram classificados 47 (72,3%) pacientes que evoluíram livres de metástase enquanto que 15 (23%) apresentaram recidiva/metástase e 29 (4,7%) pacientes não puderam ser classificados. A maior parte

deste últimos pacientes não possuía tempo de seguimento suficiente para permitir tal classificação e, por isso, foram eliminados de qualquer avaliação referente à evolução.

3.2 Metodologias

3.2.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de tecidos congelados em nitrogênio líquido de tumores de tireoide retirados do Biobanco de Tumores do Hospital AC Camargo. As amostras foram submetidas à análise histológica por um patologista experiente (Dr. Antonio Hugo José Fróes Marques Campos – Hospital AC Camargo) para avaliar o tecido de interesse. Somente amostras com pelo menos 70% de células malignas foram incluídas no estudo e seguiram para extração do DNA no Laboratório de Banco de Macromoléculas do Hospital AC Camargo. Foram dissecadas manualmente amostras que continham tecido não neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes. Resumidamente o processo de purificação do DNA consiste em digerir o tecido em 600 µL de uma solução contendo 25mM EDTA pH 8; sódio 7.5ul dodecyl sulphate (SDS) 20%, NaCl 100 mM; 100mM Tris-HCl e 300ug proteinase K e incubar a 55°C por 18h agitando num termomixer. O DNA genômico foi separado da fase orgânica por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1) usando um tubo *Phase Lock Gel* - PLG (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), precipitado em etanol absoluto e eluído em Tris-EDTA (pH 8,0). A quantidade e a pureza DNA foram avaliadas por meio Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) e a integridade por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR-Safe DNA gel stain (10.000X concentrated in DMSO – Invitrogen Life Technologies, USA).

3.2.2 Análise dos genes *NRAS*, *HRAS* e *BRAF*

Para a verificação da presença ou ausência das mutações foi utilizada a técnica de *Taqman® SNP Genotyping* 7500 Real Time PCR Systems. Tal técnica tem como base a estabilidade térmica do DNA de dupla fita como demonstra a figura 4. Em condições de alta estridência, essa estabilidade é suficiente para distinguir entre pares de sonda o DNA-

alvo perfeitos e imperfeitos. A hibridização só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA-alvo. Assim, podem ser construídas sondas específicas para cada alelo. O ensaio para genotipagem de *TaqMan*® *SNP Genotyping*, constitui uma combinação da hibridização e da atividade exonucleásica 5' da DNA-polimerase, acoplada à detecção de fluorescência (93).

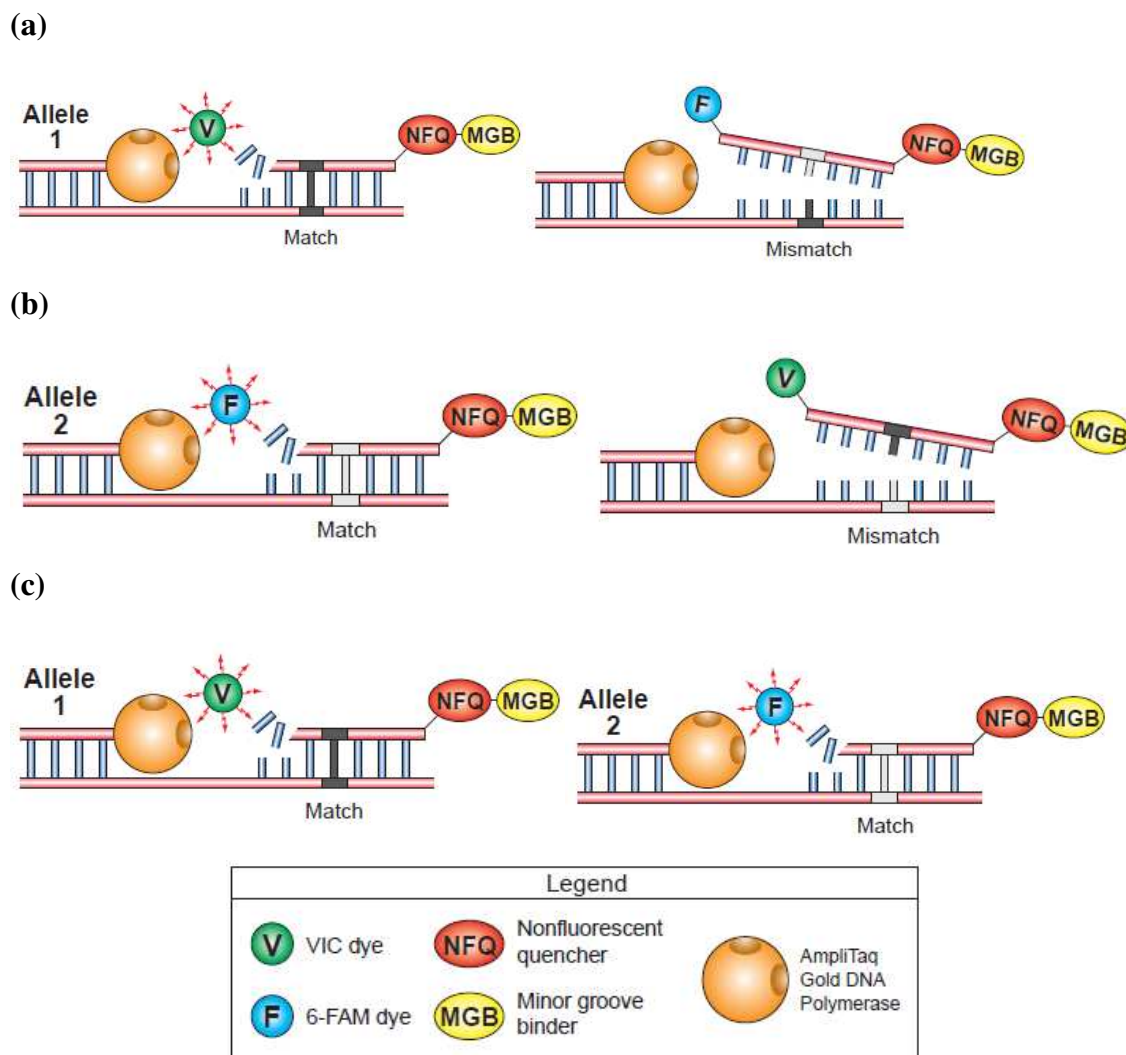


Figura 4. Imagem adaptada de Livak e colaboradores (94) mostrando o esquema de ligações entre o alvo e sequências de sonda pela técnica TaqMan. (a): Ligação apenas da sonda VIC indicando o genótipo homozigoto. (b): Ligação da sonda FAM, indicando também o genótipo homozigoto. (c): Ligação da sonda VIC e da sonda FAM indicando o genótipo heterozigoto.

As probes e os primers foram adquiridos pela *TaqMan® SNP Genotyping* (Applied Biosystems, CA, USA) e estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1. Genes estudados com suas respectivas sondas

Gene	Identificação do ensaio	RS	Concentração	Sonda VIC/FAM
<i>NRAS</i>	C_44193858_10	rs11554290	40x	TCTTCT[C/T]GTCCAGC
<i>HRAS</i>	C_64235441_10	rs28933406	40x	CCTCCT[G/T]GCCGGC
<i>BRAF</i>	AH1RXNY	-	40x	CTACAG[T/A]GAAATC

Para a realização da técnica, o DNA foi diluído à concentração de 10 ng/μL. O volume utilizado na solução final foi de 5 μL, contendo 20 ng de DNA da amostra, 2,5 μL de Taqman universal PCR Master Mix (concentração final 1X), 0,125 μL do ensaio (sondas e primers) para a concentração de 40x e 2,25 μL de água milli-q. Em todas as reações utilizou-se um controle negativo e outro positivo.

Os seguintes ciclos foram utilizados na PCR: a fase inicial de desnaturação foi de dez minutos a 95°C, seguida por 50 ciclos de 92°C por 15 segundos, 60°C por 90 segundos. O software utilizado para a análise foi “Sequence Detection Software”, versão 1.3 (Applied Biosystems, CA, USA).

Nas figuras 5, 6, 7 e 8, exemplificamos os resultados observados no Real Time para os genes *NRAS* códon 61, *HRAS* códon 61 e *BRAF V600E*.

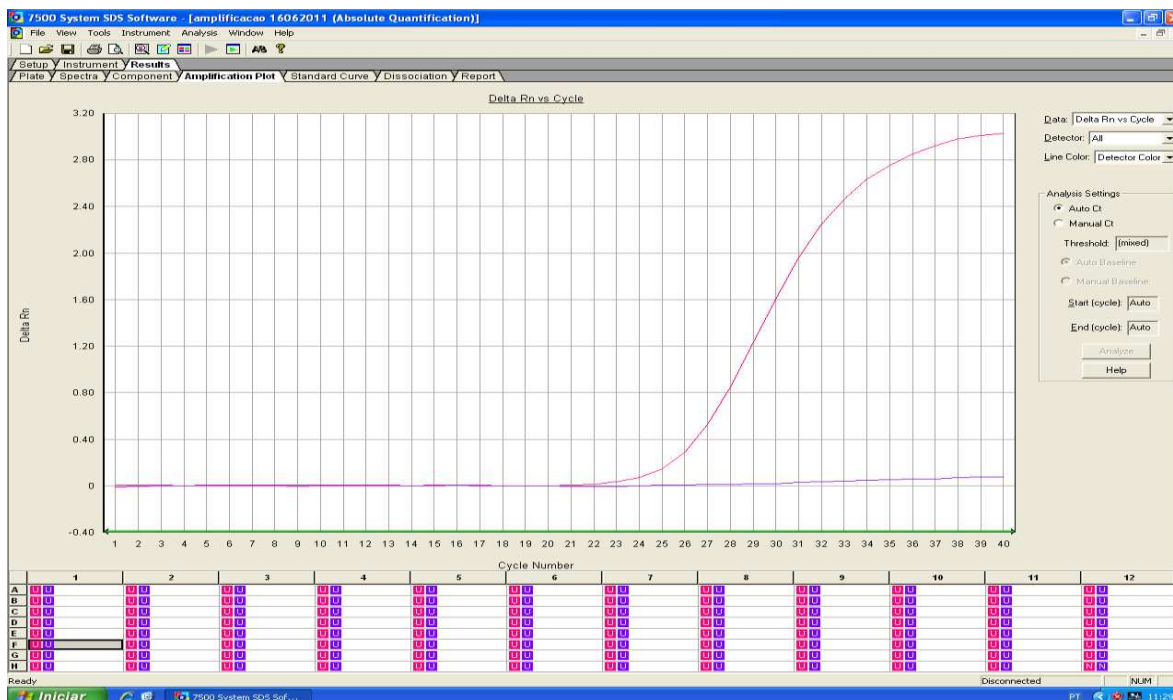


Figura 5. Resultado da técnica *TaqMan*® SNP Genotyping. A curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto selvagem.

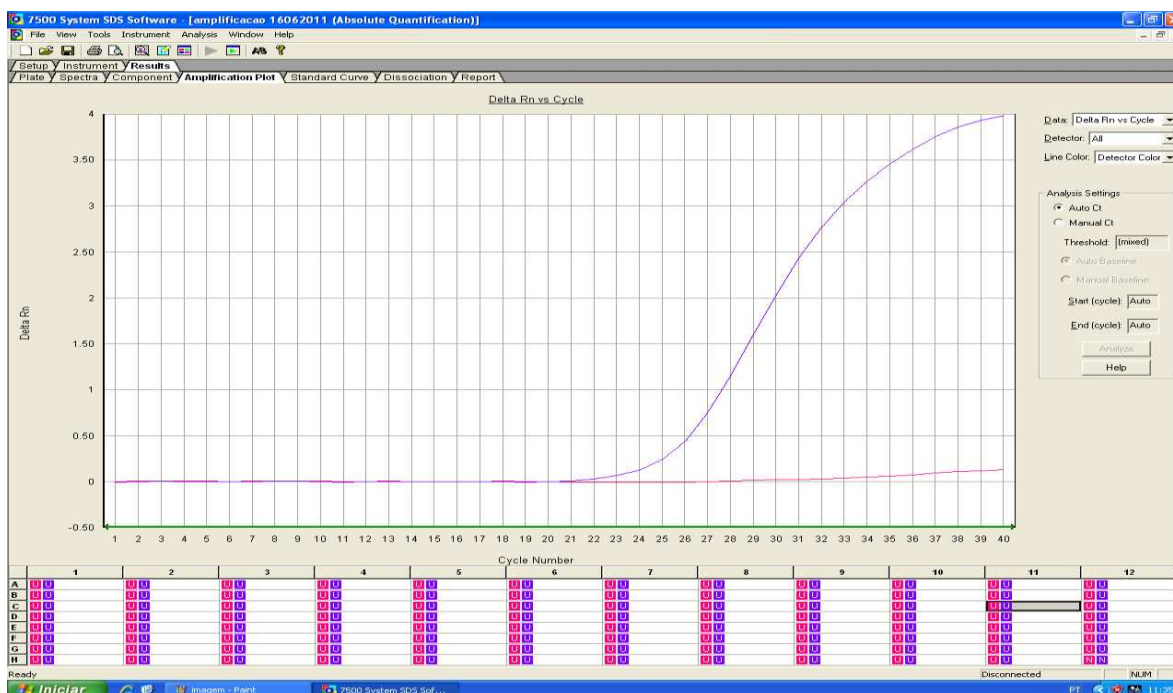


Figura 6. Resultado da técnica *TaqMan*® SNP Genotyping na qual a curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto mutado.

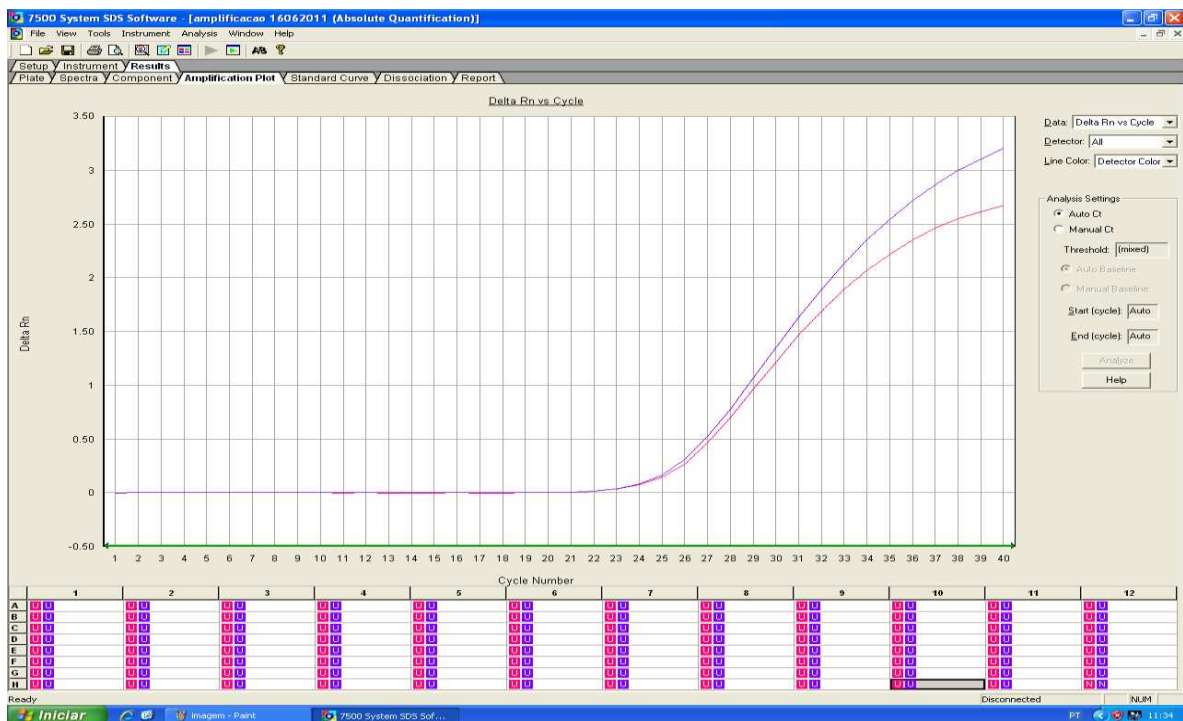


Figura 7. Resultado da técnica *TaqMan*® SNP Genotyping. As curvas indicam que o indivíduo apresenta o genótipo heterozigoto.

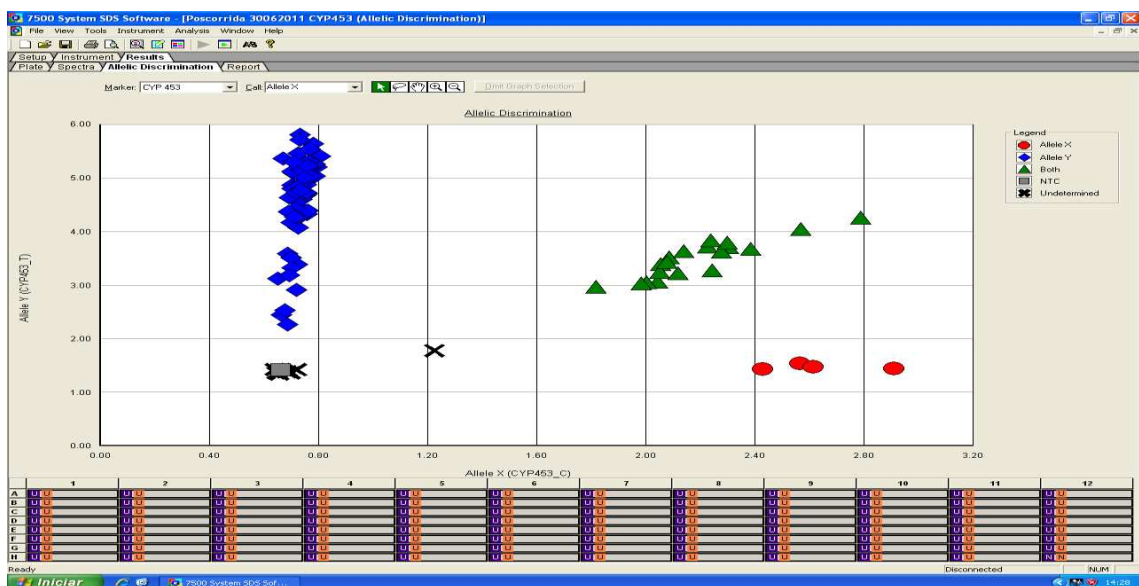


Figura 8. Resumo dos resultados da técnica *TaqMan*® SNP Genotyping. Em azul estão representadas as amostras que são homozigotas para o alelo T; em verde, as amostras são heterozigotas; em vermelho, as amostras são homozigotas para o alelo C; e em preto, as amostras não foram identificadas.

3.2.3 Análise do gene *AKT1*

Após a extração de DNA foi realizada a PCR para amplificar a região de interesse do éxon 3 do gene *AKT1*. O volume utilizado na PCR foi de 25 µl, contendo 50 ng de DNA da amostra, 10 µM de cada primer (Tabela 2), 10X PCR Buffer, 25 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP e 1U Taq DNA polimerase. Foram utilizados os seguintes ciclos na PCR: a fase inicial de desnaturação foi de cinco minutos a 94°C, a etapa de anelamento foi composta por 35 ciclos de 94°C por 50 segundos, 54,4°C por 50 segundos e 72°C por um minuto. A fase de extensão final foi de 10 minutos a 72°C. O sistema utilizado foi MJ PTC-200 PCR system.

Tabela 2. Primer utilizado para amplificação dos fragmentos do éxon 3 do gene *AKT1*

Primers		Sequências
<i>AKT1</i> éxon 3	Sense	5' – AAGAAACAGCTCCCGTACCG – 3'
	Anti-sense	5' – CCAACCCCCCAAATCTGAAT – 3'

O produto obtido na reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com GelRedTM Nucleic Acid Stain (10.000x concentrated in DMSO – Biotum, Hayward, CA, USA) e visualizados com iluminação ultravioleta. A figura a seguir mostra a imagem do gel de agarose que foi documentada após a corrida de eletroforese. A amostra referente ao controle da PCR não apresentou nenhuma banda.

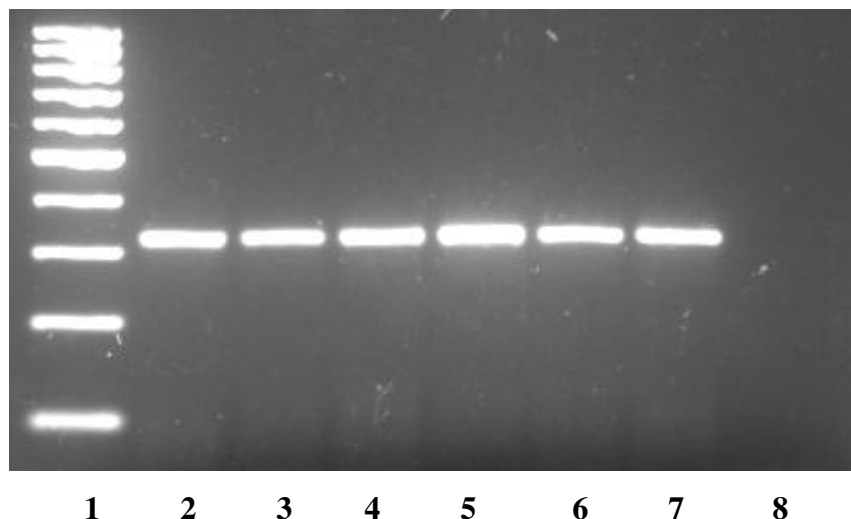


Figura 9. Resultado da PCR do éxon 3 do gene *AKT1* em gel de agarose corado com GelRed™ Nucleic Acid Stain. 1: Ladder de 100pb; 2-7: banda de 320pb do éxon 3 de *AKT1* presente; 8: controle negativo.

No próximo passo, o DNA foi submetido ao sequenciamento automático utilizando a metodologia SANGER.

Primeiramente, foi necessário fazer a purificação do produto de PCR para eliminar eventuais resíduos que pudessem interferir no resultado e na interpretação. Para tanto foram utilizados banhos de etanol seguido de centrifugações.

Após a etapa de purificação, o material foi submetido a reação de sequenciamento. Para esta reação foram utilizados para cada amostra: 13,5 µL de água, 4 µL de tampão *Save Money* 5x, 1 µL de primer, o mesmo utilizado na reação de PCR, 0,5µL de tampão BigDye e 1 µL de DNA proveniente do produto da PCR já purificada. Foram utilizados os seguintes ciclos na reação de sequenciamento: a fase inicial de desnaturação foi de um minuto e 30 segundos a 96°C e a etapa de anelamento foi composta por 25 ciclos de 96°C por 12 segundos, 50°C por 6 segundos e 60°C por 4 minutos. O sistema utilizado foi Eppendorf PCR BD-3700 system. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida e desnaturadas a 95°C, durante 5 minutos. Para evitar reanelamento do DNA, as amostras foram incubadas em gelo durante 5 minutos.

Por fim, foi realizada a leitura das amostras utilizando o sequenciador ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems - Foster, CA, USA). A interpretação dos dados foi realizada através da análise dos cromatogramas gerados a partir do

sequenciamento automático, sendo estes analisados no software denominado *CLC DNA Workbench*® (Katrinebjerg, Dinamarca).

A sequência de referência do gene *AKT1* utilizada para alinhar com as amostras sequenciadas foi retirada no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), sendo denominada como NG_012188. As alterações genéticas encontradas foram comparadas por meio de trabalhos descritos na literatura a partir do banco de dados NCBI e Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

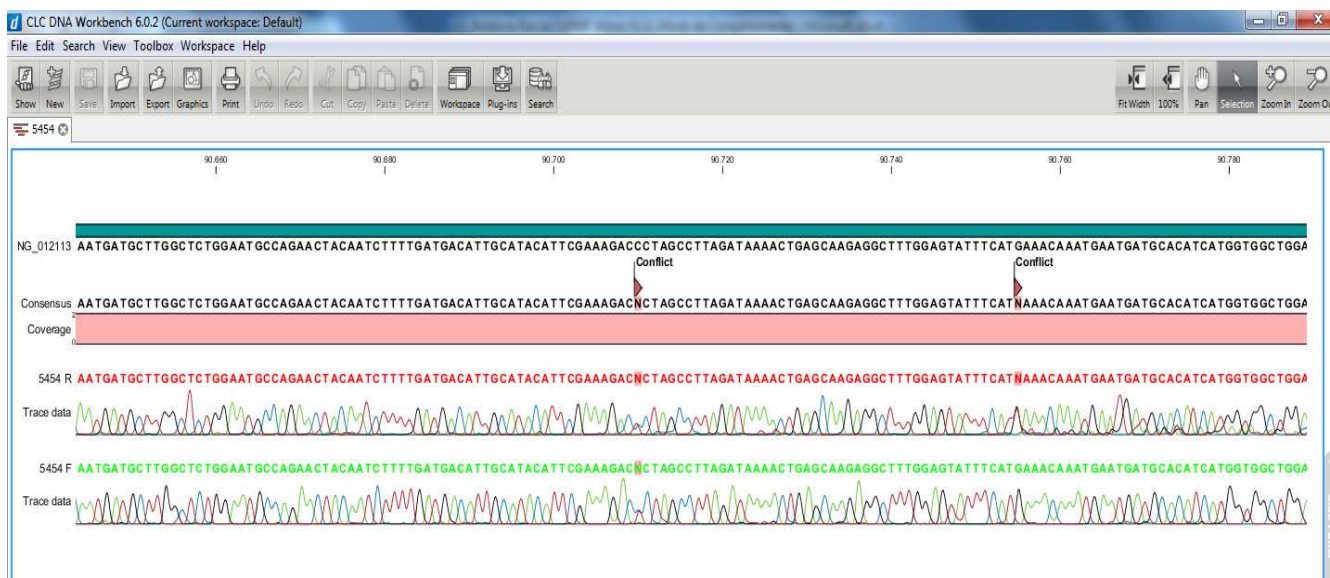


Figura 10. Exemplo de análise de sequência gênica usando software para interpretação do sequenciamento do gene *AKT1* éxon 3.

3.2.4 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SAS (Statistical Analyses System, versão 9.1.3, Cary, NC, USA, 2002-2003). Foram utilizados os testes de Qui-Quadrado ou teste Exato de Fischer para verificar associações e/ou comparar proporções. Para a análise de sobrevida foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. O *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95% “confidence interval – CI” foram usados para indicar o risco que um determinado genótipo de um determinado nódulo possui em relação ao grupo controle. Para identificar fatores de risco para as doenças foi utilizada a análise de regressão logística múltipla. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise descritiva dos pacientes

Não houve diferença estatística entre o grupo maligno e o grupo benigno em relação à sexo (78 mulheres e 13 homens versus 154 mulheres e 35 homens) e etnia (76 brancos e 05 não-brancos versus 156 brancos e 22 não-brancos) como mostra a tabela 3. O mesmo se observa em relação à média de idade entre os dois grupos ($46,97 \pm 14,84$ versus $46,843 \pm 14,38$ anos).

Tabela 3. Relação entre grupo benigno e maligno quanto a características como sexo e etnia.

Características	Maligno (n)	Benigno (n)	Valor de p
Mulheres	78	154	0,4037
Homens	13	35	
Branco	76	156	0,1872
Não-branco	05	22	

4.2 Resultados para a mutação Q61R do gene *NRAS*

4.2.1 Análise diagnóstica

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos da mutação no códon 61 do gene *NRAS* no grupo benigno e maligno.

Tabela 4. Distribuição dos genótipos da mutação Q61R do gene *NRAS* entre o grupo benigno e maligno.

	Benigno		Maligno				
	AF	Bócio	CPC	CPVF	CPVCA	CF	CA
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>NRAS</i> Q61R							
Homozigoto selvagem (TT)	64 (92,7)	114 (94,2)	60 (100,0)	23 (88,5)	01 (100,0)	02 (100,0)	01 (50,0)
Heterozigoto (CT)	05 (7,3)	07 (5,8)	0 (0,0)	03 (11,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	01 (50,0)

Através do teste de Fischer, observou-se que a presença do genótipo heterozigoto da mutação Q61R de *NRAS* teve associação com o desenvolvimento do CPVF ($p=0,025$; sensibilidade: 0,1154; especificidade: 1,000; Valor preditivo positivo (VPP): 1,000; Valor proditivo negativo (VPN): 0,7229). Pois foi verificada nos 3 pacientes com CPVF (11,5%), mas em nenhum dos pacientes com CPC. Não conseguimos associar o genótipo de *NRAS* com qualquer outra característica clínica nem de agressividade na apresentação dos pacientes com CDT (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados estatísticos das características clínico-patológicas das amostras genotipadas da mutação Q61R do gene *NRAS*

	Características clínico-patológicas		Valor de <i>P</i>
Paciente	Sexo	Feminino	1,000
		Masculino	
	Idade	≤45 anos	0,08
		>45 anos	
Característica de agressividade	Diagnóstico	Maligno	0,780
		Benigno	
	Tipo Histológico	CPC	0,025
		CPVF	
	Multifocalidade tumoral	Presente	1,000
		Ausente	
	Tumor encapsulado	Com cápsula	1,000
		Sem cápsula	
	Invasão tumoral	Com invasão	0,133
		Sem invasão	
	Tamanho do tumor	<2 cm	0,129
		2-4 cm	
		>4 cm	
	Estadio	I	1,000
		II	
		III/IV	
	Metástase ao diagnóstico	Presente	0,298
		Ausente	

4.2.2 Análise prognóstica

Em relação à análise prognóstica da presença da mutação Q61R de *NRAS* observou-se que não teve utilidade clínica ($p=0,39797$), como mostra o gráfico 1.

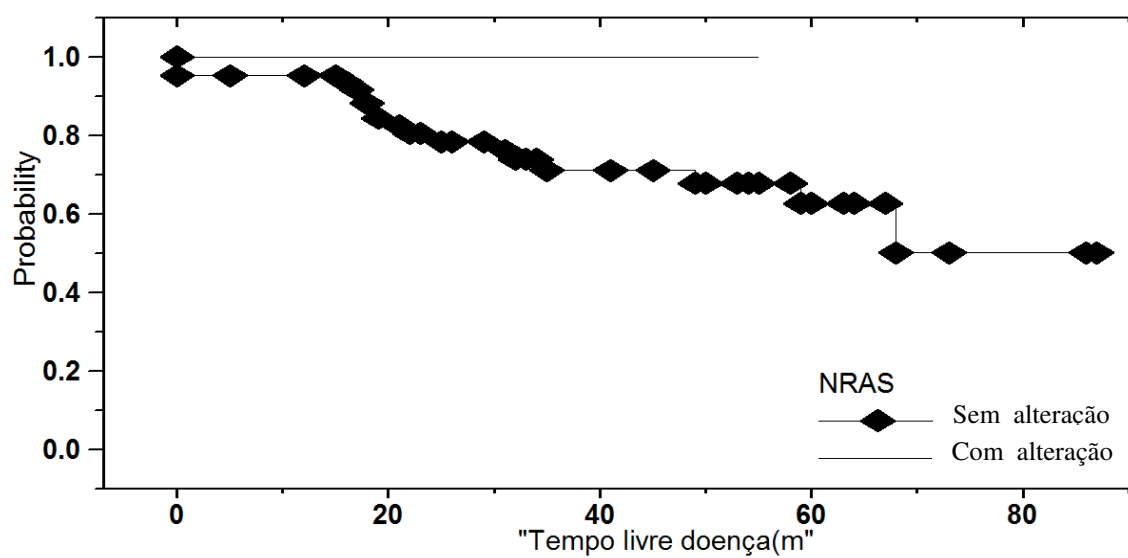


Gráfico 1. Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da mutação Q61R de *NRAS*

4.3 Resultados para a mutação Q61K do gene *HRAS*

A mutação de *HRAS* no códon 61 foi encontrada em heterozigose (GT) em apenas um indivíduo que desenvolveu adenoma folicular, sendo os pacientes restantes homozigotos selvagens (GG). Não encontramos nenhuma amostra mutada em homozigose (Tabela 6). Esta mutação não teve utilidade nem para diagnóstico nem para o prognóstico.

Tabela 6. Distribuição dos genótipos da mutação Q61K do gene *HRAS* entre o grupo benigno e maligno

	Benigno		Maligno				
	AF	Bócio	CPC	CPVF	CPVCA	CF	CA
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>HRAS</i> Q61K							
Homozigoto selvagem (GG)	68 (98,5)	120 (100,0)	61 (100,0)	26 (100,0)	01 (100,0)	02 (100,0)	02 (100,0)
Heterozigoto (GT)	01 (1,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

4.4 Resultados para a mutação V600E do gene *BRAF*

4.4.1 Análise diagnóstica

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos da mutação no códon V600E do gene *BRAF* no grupo benigno e maligno. Observamos entre o grupo benigno apenas o genótipo homozigoto selvagem (TT) em 189 pacientes (100%), não sendo encontrado nenhum caso com o genótipo heterozigoto (AT) ou homozigoto mutado (AA) como mostra a tabela 7.

Tabela 7. Distribuição dos genótipos da mutação V600E do gene *BRAF* entre o grupo benigno e maligno

	Benigno		Maligno				
	AF	Bócio	CPC	CPVF	CPVCA	CF	CA
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>BRAF</i> V600E							
Homozigoto selvagem (TT)	69 (100,0)	120 (100,0)	22 (36,1)	14 (53,8)	01 (100,0)	02 (100,0)	02 (100,0)
Heterozigoto (AT)	0 (0,0)	0 (0,0)	39 (63,9)	12 (46,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Observamos que o genótipo heterozigoto (AT) era mais frequente em pacientes com tumores malignos do que em benignos ($p < 0,001$) (Tabela 7). Assim, a presença deste genótipo foi capaz de identificar malignidade em nódulos com sensibilidade: 0,5714; especificidade: 1,000; VPP: 1,000; VPN: 0,8289. Uma análise de regressão logística confirma que a herança deste genótipo está significativamente associado ao desenvolvimento do carcinoma papilífero da tireoide ($p < 0,001$; OR: 309,7; IC 95%: 18,26-5251,54). Não encontramos nenhuma relação desta mutação com mais nenhuma das características clínicas ou patológicas dos pacientes, como mostra a tabela 8.

Tabela 8. Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à mutação V600E do gene *BRAF*

	Características clínico-patológicas		Valor de <i>P</i>
Paciente	Sexo	Feminino	1,000
		Masculino	
	Idade	≤45 anos	0,642
		>45 anos	
Característica de agressividade	Diagnóstico	Maligno	<0,001
		Benigno	
	Tipo Histológico	CPC	0,102
		CPVF	
	Multifocalidade tumoral	Presente	0,528
		Ausente	
	Tumor encapsulado	Com cápsula	0,649
		Sem cápsula	
	Invasão tumoral	Com invasão	0,145
		Sem invasão	
	Tamanho do tumor	<2 cm	0,061
		2-4 cm	
		>4 cm	
	Estadio	I	0,622
		II	
		III/IV	
	Metástase ao diagnóstico	Presente	0,763
		Ausente	

4.4.2 Análise prognóstica

Quanto a análise prognóstica, não encontramos relação da presença da mutação do gene *BRAF* V600E com o comportamento evolutivo dos pacientes ($p=0,52001$) como mostra o gráfico 2.

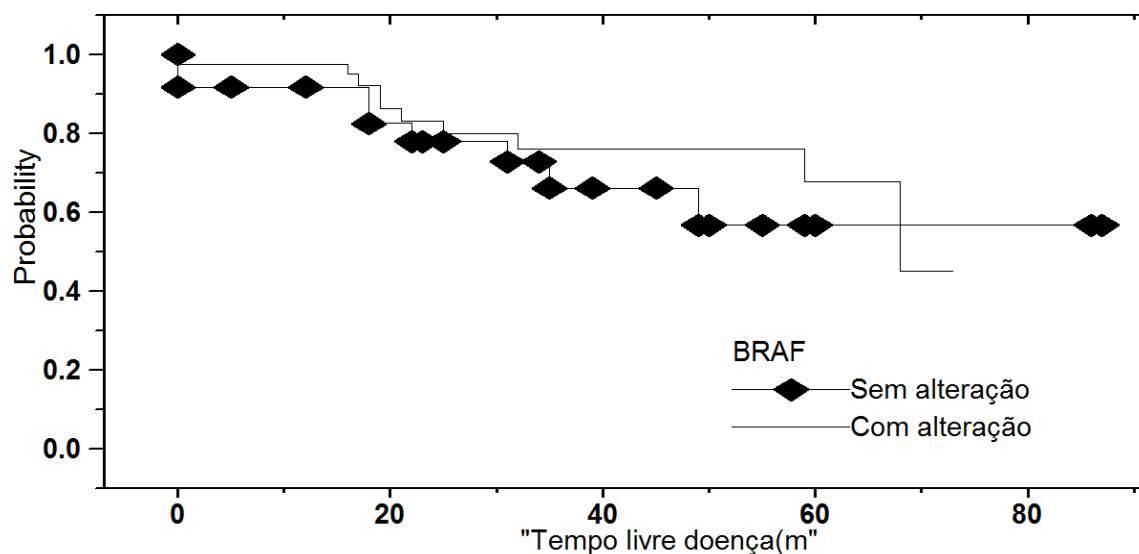


Gráfico 2. Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da mutação V600E de *BRAF*

4.5 Resultados para o gene *AKT1* éxon 3

O sequenciamento automático mostrou a presença de alterações no éxon 3 do gene *AKT1* em 114 (41,76%) pacientes e a ausência de alterações em 159 (58,24%) pacientes. Foram observadas quatro tipos de alterações nesta região, sendo 3 na região intrônica e uma na região exônica. As alterações encontradas foram rs2494738, rs3730368, IVS318C>T (rs3730358), sendo as duas primeiras no íntron 3 e a última no íntron 4 e; a alteração L52R encontra-se no éxon 3.

Todas estas alterações são mutações pontuais, sendo a alteração rs2494738 uma substituição da base nitrogenada guanina por uma adenina na posição intrônica 20396 da sequência genômica e as alterações rs3730368 e rs3730358 trocam uma base pirimidina (C)

por outra pirimidina (T) na posição 20453 e 20675 respectivamente, portanto são mutações de transição de bases.

Por fim, a alteração exônica L52R ocorre a troca de um aminoácido Leucina por uma Arginina no códon 52, ou seja, trocando um aminoácido não-polar por um de carga positiva.

4.5.1 Resultados para a alteração *AKT1* rs2494738

4.5.1.1 Análise diagnóstica

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos da alteração intrônica rs2494738 do gene *AKT1* no grupo benigno e maligno.

Tabela 9. Distribuição dos genótipos obtidos para a alteração rs2494738 do gene *AKT1* entre o grupo benigno e maligno

	Benigno		Maligno				
	AF	Bócio	CPC	CPVF	CPVCA	CF	CA
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>AKT1</i> (rs2494738)							
Homozigoto selvagem (GG)	44 (88,0)	64 (88,9)	49 (90,8)	19 (79,2)	01 (100,0)	01 (100,0)	01 (100,0)
Heterozigoto (AG)	05 (10,0)	07 (9,8)	05 (9,2)	05 (20,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Homozigoto mutado (AA)	01 (2,0)	01 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Analisando as características de agressividade no grupo maligno, observou-se que o genótipo heterozigoto (AG) da alteração rs2494738 do gene *AKT1* se associou com ausência de invasão tumoral em pacientes com CDT ($p=0,004$), de modo que este genótipo

identificou esta característica com sensibilidade: 0,2222; especificidade: 1,000; VPP: 1,000; VPN: 0,4853. Não houve correlação com outras características clínicas ou tumorais como mostra a tabela 10.

Tabela 10. Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à alteração na região intrônica (rs2494738) do gene *AKT1*

	Características clínico-patológicas		Valor de <i>P</i>
Paciente	Sexo	Feminino	0,776
		Masculino	
	Idade	≤45 anos	1,000
		>45 anos	
Característica de agressividade	Diagnóstico	Maligno	0,565
		Benigno	
	Tipo Histológico	CPC	0,270
		CPVF	
	Multifocalidade tumoral	Presente	0,470
		Ausente	
	Tumor encapsulado	Com cápsula	0,219
		Sem cápsula	
	Invasão tumoral	Com invasão	0,004
		Sem invasão	
	Tamanho do tumor	<2 cm	0,397
		2-4 cm	
		>4 cm	
	Estadio	I	0,863
		II	
		III/IV	
	Metástase ao diagnóstico	Presente	1,000
		Ausente	

4.5.1.2 Análise prognóstica

Na análise da sobrevida dos pacientes, a presença da alteração rs2494738 encontrada no éxon 3 do gene *AKT1* não mostrou utilidade clínica ($p=0,09571$) como mostra o gráfico 3.

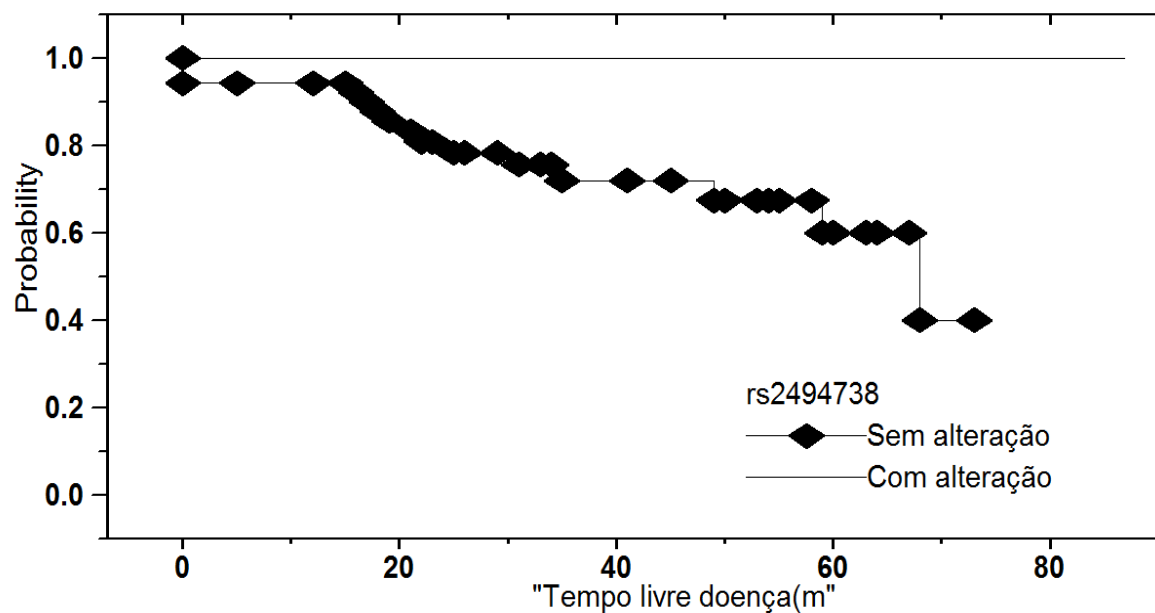


Gráfico 3. Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da alteração rs2494738 encontrada no éxon 3 do gene *AKT1*

4.5.2 Resultados para a alteração *AKT1* rs3730368

4.5.2.1 Análise diagnóstica

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos da alteração intrônica rs3730368 do gene *AKT1* no grupo benigno e maligno.

Tabela 11. Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à alteração rs3730368 do gene *AKT1* entre o grupo benigno e maligno

	Benigno		Maligno				
	AF	Bócio	CPC	CPVF	CPVCA	CF	CA
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>AKT1</i> (rs3730368)							
Homozigoto selvagem (CC)	67 (98,5)	108 (93,9)	61 (100,0)	26 (100,0)	01 (100,0)	01 (100,0)	01 (100,0)
Heterozigoto (CT)	01 (1,5)	05 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Homozigoto mutado (TT)	0 (0,0)	02 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Na análise de regressão logística foi demonstrado que a herança do genótipo heterozigoto ou o mutado é um fator de proteção no desenvolvimento de tumores malignos ($p=0,046$; OR: 0,12; IC95%: 0,01-0,99). Além disso, observamos através do teste exato de Fischer que a presença do genótipo selvagem (CC) desta alteração se associou com o desenvolvimento do nódulo benigno menores de 2cm ($p=0,033$; Sensibilidade: 1,000; Especificidade: 0,08889; VPP: 0,5859; VPN: 1,000).

Não foi encontrado mais nenhuma significância estatística com as características clínicas analisadas como mostra a tabela 12.

Tabela 12. Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à alteração na região intrônica (rs3730368) do gene *AKT1*

	Características clínico-patológicas		Valor de <i>P</i>
Paciente	Sexo	Feminino	1,000
		Masculino	
	Idade	≤45 anos	1,000
		>45 anos	
Característica de agressividade	Diagnóstico	Maligno	0,046
		Benigno	
	Tipo Histológico	CPC	NS
		CPVF	
	Multifocalidade tumoral	Presente	NS
		Ausente	
	Tumor encapsulado	Com cápsula	NS
		Sem cápsula	
	Invasão tumoral	Com invasão	NS
		Sem invasão	
	Tamanho do tumor	<2 cm	0,033
		2-4 cm	
		>4 cm	
	Estadio	I	NS
		II	
		III/IV	
	Metástase ao diagnóstico	Presente	NS
		Ausente	

4.5.3 Resultados para a alteração *AKT1* rs3730358

4.5.3.1 Análise diagnóstica

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos da alteração intrônica IVS318C>T (rs3730358) do gene *AKT1* no grupo benigno e maligno.

Tabela 13. Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à alteração rs3730358 do gene *AKT1* entre o grupo benigno e maligno

	Benigno		Maligno				
	AF	Bócio	CPC	CPVF	CPVCA	CF	CA
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>AKT1</i> (rs3730358)							
Homozigoto selvagem (CC)	49 (73,0)	94 (82,7)	53 (86,9)	19 (73,1)	01 (100,0)	01 (100,0)	01 (100,0)
Heterozigoto (CT)	12 (17,6)	15 (13,0)	06 (9,8)	05 (19,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Homozigoto mutado (TT)	07 (9,4)	06 (4,3)	02 (3,3)	02 (7,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Analisando a presença desta alteração em comparação com características de agressividade ao diagnóstico observamos no grupo maligno, uma associação dos indivíduos que possuíam o genótipo heterozigoto (CT) com o desenvolvimento de tumores menores de 2cm ($p=0,032$; Sensibilidade: 0,1034; Especificidade: 0,5000; VPP: 0,6667; VPN: 0,05455), como mostra a tabela 14.

Tabela 14. Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à alteração rs3730358 do gene *AKT1*

	Características clínico-patológicas		Valor de <i>P</i>
Paciente	Sexo	Feminino	0,062
		Masculino	
	Idade	≤45 anos	0,861
		>45 anos	
Característica de agressividade	Diagnóstico	Maligno	0,581
		Benigno	
	Tipo Histológico	CPC	0,269
		CPVF	
	Multifocalidade tumoral	Presente	1,000
		Ausente	
	Tumor encapsulado	Com cápsula	0,094
		Sem cápsula	
	Invasão tumoral	Com invasão	0,124
		Sem invasão	
	Tamanho do tumor	<2 cm	0,032
		2-4 cm	
		>4 cm	
	Estadio	I	0,440
		II	
		III/IV	
	Metástase ao diagnóstico	Presente	1,000
		Ausente	

4.5.3.2 Análise prognóstica

Na análise prognóstica através da curva de Kaplan-Meier observou-se que esta alteração não teve utilidade clínica ($p=0,64404$) como mostra o gráfico 4.

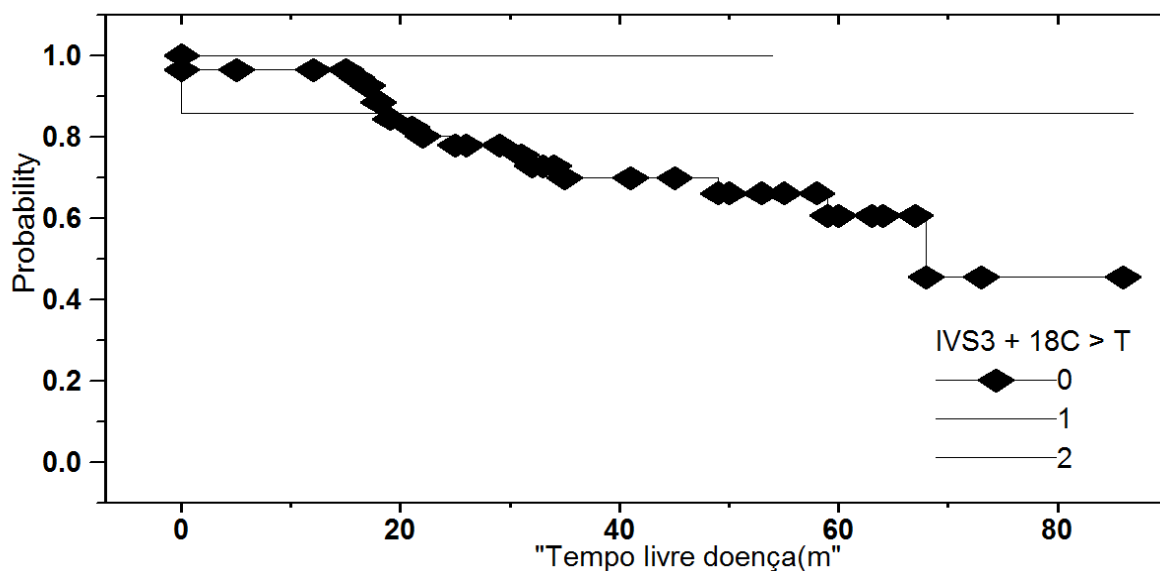


Gráfico 4. Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da alteração rs3730358 encontrada no éxon 3 do gene *AKT1*

4.5.4 Resultados para a alteração *AKT1* L52R

4.5.4.1 Análise diagnóstica

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos da alteração exônica (L52R) do gene *AKT1* no grupo benigno e maligno.

Tabela 15. Distribuição dos genótipos das amostras genotipadas em relação à alteração L52R do gene *AKT1* entre o grupo benigno e maligno

	Benigno		Maligno				
	AF	Bócio	CPC	CPVF	CPVCA	CF	CA
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>AKT1</i> (L52R)							
Homozigoto selvagem (TT)	46 (67,6)	84 (82,7)	53 (86,9)	25 (96,1)	01 (100,0)	01 (100,0)	01 (100,0)
Heterozigoto (TG)	22 (32,4)	27 (13,0)	07 (11,5)	01 (3,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Homozigoto mutado (GG)	0 (0,0)	04 (4,3)	01 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Quando comparamos a presença desta alteração com as características clínicas investigadas observamos que os indivíduos que apresentaram o genótipo heterozigoto (TG) apresentavam nódulos malignos ($p=0,004$; sensibilidade: 0,0909; especificidade: 0,7263; VPP: 0,1404; VPN: 0,6190) e tumores encapsulados ($p=0,0387$; sensibilidade: 0,2353; especificidade: 0,9500; VPP: 0,5714; VPN: 0,8143) como mostra a tabela 16. Além disso, observamos que os indivíduos que possuíam o genótipo heterozigoto se relacionaram com o desenvolvimento do nódulo benigno menores de 2cm ($p=0,029$; Sensibilidade: 0,2632; Especificidade: 1,000; VPP: 1,000; VPN: 0,2632) e de 2-4cm ($p=0,012$; Sensibilidade: 0,3125; Especificidade: 1,000; VPP: 1,000; VPN: 0,3333) (Tabela 23). Já na análise de regressão logística foi demonstrado que indivíduos com genótipo selvagem possuíam maior risco de desenvolver tumores malignos ($p<0,001$; OR: 3,62; IC95%: 1,70-7,74). Entretanto, o genótipo da alteração L52R do gene *AKT1* não se relacionou com as demais características investigadas.

Tabela 16. Características clínico-patológicas das amostras genotipadas em relação à alteração na região exônica (L52R) do gene *AKT1*

	Características clínico-patológicas		Valor de <i>P</i>
Paciente	Sexo	Feminino	0,692
		Masculino	
	Idade	≤45 anos	0,456
		>45 anos	
Característica de agressividade	Diagnóstico	Maligno	0,0004
		Benigno	
	Tipo Histológico	CPC	0,603
		CPVF	
	Multifocalidade tumoral	Presente	1,000
		Ausente	
	Tumor encapsulado	Com cápsula	0,038
		Sem cápsula	
	Invasão tumoral	Com invasão	0,821
		Sem invasão	
	Tamanho do tumor	<2 cm	0,029
		2-4 cm	0,012
		>4 cm	
	Estadio	I	0,666
		II	
		III/IV	
	Metástase ao diagnóstico	Presente	0,774
		Ausente	

4.4.4.2 Análise prognóstica

Na análise de sobrevida, a presença da alteração L52R não demonstrou utilidade clínica ($p=0,17709$) como mostra o gráfico 5 .

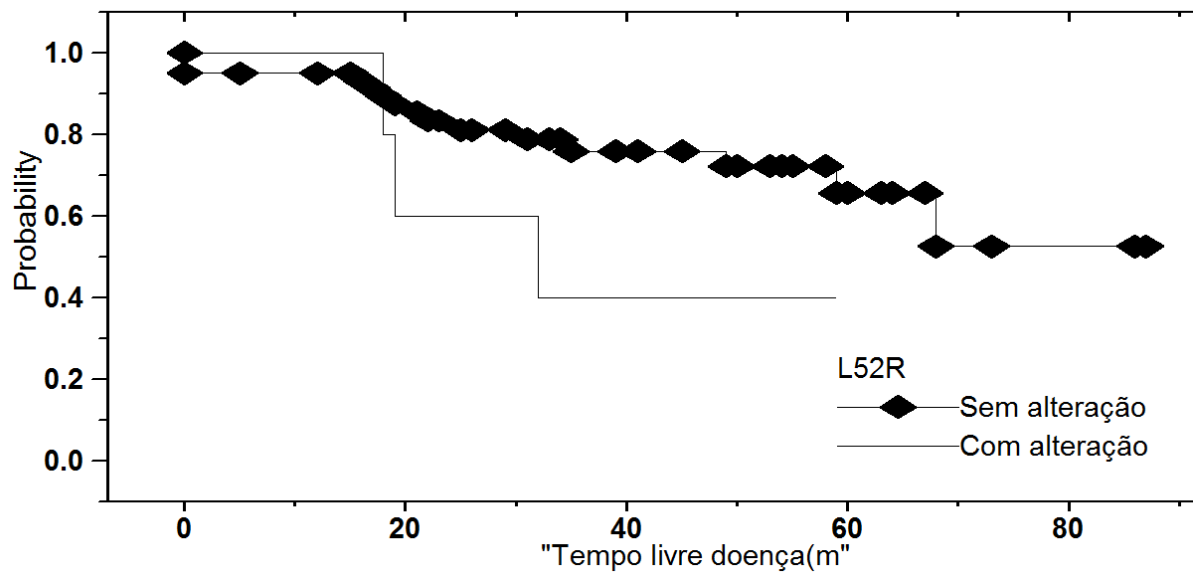


Gráfico 5. Análise de sobrevida a partir do teste de Kaplan-Meier para a presença da alteração L52R encontrada no éxon 3 do gene *AKT1*

5 RESUMO DOS ACHADOS

Portanto, observamos quatro alterações genéticas encontradas na via PI3K/AKT através do gene *AKT1*, sendo três na região intrônica e uma exônica, as quais demonstraram associações com algumas características clínicas patológicas relacionados ao desenvolvimento do CDT, demonstrando o valor destas alterações como um possível marcador de diagnóstico.

Dentre as alterações intrônicas observamos que:

- O genótipo heterozigoto da alteração rs2494738 se relacionou com a ausência de insavão tumoral;
- O genótipo heterozigoto da alteração rs3730368 se relacionou como fator protetor no desenvolvimento de tumores malignos e o genótipo selvagem com o desenvolvimento de tumores benignos menores de 2cm.
- O genótipo heterozigoto da alteração rs3730358 se associou com o desenvolvimento de tumores malignos menores de 2cm.

Já a alteração exônica L52R se relacionou com o desenvolvimento de tumores malignos e encapsulados e, entre o grupo benigno se associou com o desenvolvimento de tumores menores de 2cm e tumores de 2-4cm.

Em relação as mutações investigadas na via MAPK, demonstramos que a presença da mutação Q61R de *NRAS* se associou com o desenvolvimento do CPVF, sugerindo que esta mutação possa ser um possível marcador de diagnóstico. No entanto, a mutação Q61K de *HRAS* não teve utilidade clínica. A mutação V600E de *BRAF* esteve presente apenas em indivíduos que desenvolveram CPT, confirmando que a presença desta mutação é um bom marcador de diagnóstico para CPT.

Porém, nenhuma alteração investigada neste estudo demonstrou ter utilidade prognóstica. Isto se deve talvez pelo baixo tempo de seguimento destes pacientes analisados.

6 DISCUSSÃO

A carcinogênese tireoidiana é complexa e diversos fatores etiológicos como, a deficiência de iodo, a predisposição genética, a irradiação ionizante e a exposição a agentes químicos carcinogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do câncer de tireoide (95-98). Estes fatores podem eventualmente levar a tumorigênese através de alterações moleculares em diversas vias de sinalização (99-100). Como a presença de alterações genéticas são comumente encontradas nas vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK, estas duas vias tem se tornado um importante alvo para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para diferentes tipos de câncer (101-103). Assim, o enfoque deste trabalho foi investigar as alterações em alguns dos genes pertencentes a via MAPK e PI3K/AKT, mais especificamente, nos genes *BRAF* V600E, *NRAS* Q61R e *HRAS* Q61K e no éxon 3 do gene *AKT1* em pacientes com neoplasia tireoidiana a fim de estabelecer sua possível utilidade como marcadores de diagnóstico e prognóstico.

Nossos resultados demonstraram que existem alterações no éxon 3 do gene *AKT1* em câncer de tireoide, sendo estas presentes tanto na região intrônica (rs2494738, rs3730368 e 3730358) quanto na região exônica (L52R). Estas alterações ainda não foram descritas em câncer de tireoide, embora algumas delas tenham sido encontradas em outras doenças humanas, como por exemplo em câncer de pulmão, de esôfago e na esquizofrenia (104-106).

Polimorfismos com troca de uma única base (SNP- *single nucleotide polymorphism*) são as formas mais comumente encontradas nas variações genéticas humanas. Diversos estudos tem demonstrado que alguns destes SNPs afetam tanto a expressão quanto a atividade das enzimas, por isso estão associados com risco de desenvolvimento de câncer (107-109). Recentemente, SNPs e haplótipos do gene *AKT1* foram relacionados com os níveis de expressão da proteína AKT1 nos tecidos e com a sua capacidade apoptótica, sugerindo que estes SNPs possam ter importância terapêutica (106, 110).

Existem diversos polimorfismos no gene *AKT1* (111-113). Dentre os polimorfismos conhecidos, cinco SNPs tem sido relacionados mais frequentemente a doenças humanas (rs3803300A>G, rs1130214G>T, rs3730358C>T, rs1130233A>G e rs2494732C>T) (106, 110-115), tendo um deles (rs3730358) sido igualmente encontrado em nossos resultados. Demonstramos que a presença do genótipo heterozigoto (CT) desta alteração possui associação com características de agressividade, a qual relaciona-se com o

desenvolvimento de tumores malignos menores de 2cm. Este resultado concorda com os de Emamian e colaboradores (2004), os quais observaram que os haplótipos deste polimorfismo se associavam com os níveis baixos de expressão da proteína AKT1 em linfócitos e no tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (106). Um outro estudo em caucasianos, demonstrou que o haplótipo T (alterado) do polimorfismo rs3730358 diminuía o nível de expressão de proteína AKT1, enquanto que o haplótipo C (selvagem) tinha uma resposta apoptótica diminuída (110). Desta maneira, podemos sugerir que a presença desta alteração esteja relacionado com o desenvolvimento inicial do tumor.

Nossos resultados também demonstraram que o genótipo heterozigoto da alteração rs2494738 teve associação com a ausência de invasão tumoral, sendo observado também por Dillon & Muller (2010) que demonstraram que em alguns sistemas celulares AKT1 inibe a migração e invasão tumoral, como por exemplo nas células epiteliais de mama (116). Porém, outros dados da literatura descrevem níveis elevados de AKT1 fosforilado em tumores tireoidianos agressivos primários que tiveram invasão tumoral (117).

Em relação a alteração rs3730368 demonstramos que o genótipo heterozigoto se relacionou como fator protetor no desenvolvimento de tumores malignos e o genótipo selvagem com o desenvolvimento de tumores benignos menores de 2cm. Com isso, sugere-se que esta alteração possa ser um possível marcador de diagnóstico para tumores benignos, porém na literatura há poucos trabalhos que descrevem esta alteração associada a cânceres. Em um trabalho, Bleeker e colaboradores (2009) descreveu a presença desta alteração em pacientes com glioblastoma, mas neste estudo o grupo não investigou a correlação com características clínicas da doença (118).

Já a alteração exônica L52R se relacionou com o desenvolvimento de tumores malignos e encapsulados. Estes dados concordam com trabalhos descritos na literatura que observaram maior expressão e ativação de AKT1 em amostras malignas do que em benignas (80, 119-120). No entanto, entre o grupo benigno observamos que a presença desta alteração se associou com o desenvolvimento de tumores menores de 2cm e de 2-4cm, sugerindo que esta alteração esteja relacionada com eventos iniciais no desenvolvimento tumoral.

Em relação as mutações investigadas na via MAPK, comprovamos a literatura ao não encontrarmos uma frequência alta da mutação Q61K de *HRAS*, resultado também

encontrado por Vasko e colaboradores (2003) que demonstraram a presença desta mutação em apenas 1,4% dos tumores foliculares malignos (121). O único indivíduo que possuía esta mutação no nosso estudo desenvolveu adenoma folicular, sendo um resultado semelhante encontrado por um grupo japonês (122). Porém, não conseguimos demonstrar nenhuma utilidade clínica desta mutação.

Um grupo francês analisou a mutação Q61R de *NRAS* e encontraram que a presença desta mutação era frequentemente encontradas em tumores foliculares (19%) do que em carcinomas papilíferos (5%), e nos tumores foliculares eram mais frequentes nos carcinomas (24%) do que nos adenomas (14%) (121). Em outro estudo realizado por um grupo japonês que também investigou as mutações no gene *RAS* observou que esta alteração está presente tanto nos adenomas (30%) quanto nos carcinomas foliculares (57%), sendo a mutação Q61R de *NRAS* significativamente mais frequente nos carcinomas do que nos adenomas (122). Demonstramos que a presença do genótipo heterozigoto da mutação Q61R de *NRAS* esteve presente em pacientes que desenvolveram o CPVF. Nosso resultado concorda com os encontrados por Rivera e colaboradores (2010) que encontraram mutações no gene *RAS* em 36% dos CPVF encapsulados (123). Embora só pudéssemos estudar 3 casos desta variante, estes dados podem ser muito interessantes, de modo que estamos aumentando a casuística para comprovar uma possível associação entre esta mutação e o subtipo histológico em questão.

Em nosso trabalho não conseguimos associar a presença da mutação de *NRAS* com mais nenhuma característica clínico-patológica no desenvolvimento do CDT e com a evolução clínica dos pacientes. No entanto, Fukahori e colaboradores demonstraram que indivíduos com possuíam carcinoma folicular e a mutação no códon 61 do gene *NRAS* possuem uma associação com a ocorrência de metástases a distância e, na análise prognóstica observaram uma associação com menor tempo de sobrevida (122). O mesmo foi observado em outro estudo que sugeriu que a mutação de *RAS* pode ser um marcador de agressividade e podem ter pior evolução em pacientes com câncer de tireoide, porém este trabalho utilizou tanto CDT como carcinoma indiferenciado da tireoide (124).

Já a mutação V600E do gene *BRAF* se associou apenas com o desenvolvimento do CPT, demonstrando ser um bom marcador de diagnóstico de malignidade. Não encontramos esta mutação em nenhuma amostra benigna ou em qualquer outro subtipo

histológico do grupo maligno. A literatura claramente demonstra que esta mutação está frequentemente presente, e é restrita às células do CPT (31, 51, 125-126).

Diversos mecanismos estão envolvidos no fenótipo de agressividade do CPT que é promovido pela mutação V600E do gene *BRAF* (127). Esta mutação está localizada no éxon 15 do gene *BRAF*, a qual resulta em uma ativação da atividade kinase e promove a tumorigênese através da via MAPK (128). A formação inicial do tumor pela mutação oncogênica BRAFV600E torna as células tireoidianas susceptíveis à transformação de fatores de crescimento beta-induzidos pela transição epitélio-mesênquima, através de um processo dependente da via MAPK. Esta mutação pode também promover um aumento na produção de moléculas que promovem o câncer, tais como proteínas da matriz extracelular, trombospondina 1 (129) e fatores de crescimento derivado de plaquetas (130). Este aumento no número destas moléculas podem estar envolvidas na mutação BRAFV600E mediando a progressão e a agressividade do CPT (131).

No entanto, contrariando grande parte da literatura (55, 60, 132-135), não pudemos demonstrar nenhuma associação entre a presença desta mutação e características clínicas ou tumorais que pudessem sugerir maior agressividade, como invasão extratireoidiana, metástase linfonadais e estadios de TNM avançados (51, 55); nem com o comportamento evolutivo destes pacientes, talvez pelo tempo de seguimento relativamente curto de nossos pacientes.

Em uma metanálise, apresentada por Kim e colaboradores em 2012, demonstraram através de 27 trabalhos publicados na literatura de diversas partes do mundo que avaliaram 5655 pacientes com CPT e apresentavam a mutação V600E do gene *BRAF*, que realmente há relação com maior risco de terem características clinico-patológicas piores ao CPT e pior evolução clínica (131), porém não conseguimos demonstrar o mesmo resultado.

Outros autores falharam em demonstrar associação com agressividade e prognóstico (60, 136) como por exemplo, Xing e colaboradores em 2005 que demonstraram uma correlação entre a presença da mutação V600E de *BRAF* com estágio avançado, recorrência e morte pelo tumor depois de um tempo de seguimento longo (132). Em um trabalho recente de um grupo italiano, foi demonstrado uma correlação da presença da mutação com a idade de diagnóstico e tamanho do tumor em um período de observação de 15 anos, a

qual foi observada um aumento na identificação desta mutação em pacientes com mais idade e que desenvolveram tumores menores de 2cm (137).

Esta mutação no gene *BRAF* é muito frequente em microcarcinomas (135), cuja evolução clínica é incerta (21), sugerindo que ela se apresente em fases iniciais, implicando na ativação da via MAPK, mas que não determine obrigatoriamente uma evolução agressiva do tumor (138).

7 CONCLUSÃO

Portanto, podemos concluir que as vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT desempenha funções importantes na carcinogênese tireoidiana. Pois, demonstramos que existem alterações genéticas relevantes que possam influenciar tanto no desenvolvimento do CPT quanto nos nódulos benignos quando associadas a características clínico-patológicas dos pacientes com CDT, sugerindo que estas alterações possam servir como um possível marcador de diagnóstico para o CDT. Porém, há a necessidade de novos estudos, sendo estes funcionais que provem todos estes resultados.

8 REFERÊNCIAS

1. Saranac L, Zivanovic S, Bjelakovic B, Stamenkovic H, Novak M, Kamenov B. Why Is the Thyroid So Prone to Autoimmune Disease? *Horm Res Paediatr*. 2011;75(3):157-65.
2. Arber N, Schapiro JM, Lapidot M, Benosh L, Lubin E, Pinkhas J, et al. High-Incidence of Occult Thyroid-Disease among General Medical Ward Patients. *J Med*. 1995;26(3-4):139-52.
3. Ward LS, Graf H. [Thyroid cancer: increased occurrence of the disease or simply in its detection?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Dec;52(9):1515-6.
4. Furlanetto TW, Peccin S, de OSMA, dos SZA, dos Reis PS, Genro SK, et al. [Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women]. *Rev Assoc Med Bras*. 2000 Oct-Dec;46(4):331-4.
5. Knobel M, Medeiros-Neto G. [Disorders associated to chronic iodine deficiency]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Feb;48(1):53-61.
6. Tomimori E, Pedrinola F, Cavaliere H, Knobel M, Medeiros-Neto G. Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area. *Thyroid*. 1995 Aug;5(4):273-6.
7. Welker MJ, Orlov D. Thyroid nodules. *Am Fam Physician*. 2003 Feb 1;67(3):559-66.
8. How J, Tabah R. Explaining the increasing incidence of differentiated thyroid cancer. *CMAJ*. 2007 Nov 20;177(11):1383-4.
9. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
10. Brito Ados S, Coeli CM, Barbosa Fdos S, Caetano R, Santos Mde O, Vaisman M. Estimates of thyroid cancer incidence in Brazil: an approach using polynomial models. *Cad Saude Publica*. 2011 Jul;27(7):1441-4.
11. Brown RL, de Souza JA, Cohen EE. Thyroid cancer: burden of illness and management of disease. *J Cancer*. 2011;2:193-9.
12. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Oct;7(10):569-80.
13. Pang T, Ihre-Lundgren C, Gill A, McMullen T, Sywak M, Sidhu S, et al. Correlation between indeterminate aspiration cytology and final histopathology of thyroid neoplasms. *Surgery*. 2010 Sep;148(3):532-7.
14. 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.
15. Gharib H. Changing trends in thyroid practice: understanding nodular thyroid disease. *Endocr Pract*. 2004 Jan-Feb;10(1):31-9.
16. Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, et al. Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer*. 2000 Dec 25;90(6):335-41.
17. Sclabas GM, Staerckel GA, Shapiro SE, Fornage BD, Sherman SI, Vassilopoulou-Sellin R, et al. Fine-needle aspiration of the thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *Am J Surg*. 2003 Dec;186(6):702-9; discussion 9-10.
18. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande AA, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer*. 2007 Dec 25;111(6):508-16.
19. Ward LS MR, Camargo RY, Teixeira GV, Tincani AJ, Kulcsar MAV, Carvalho GA, Graf H, Tomimori E, Maia AL, Kimura ET, Vaisman M, Hojaij FC, Araújo PPC, Miyahara L, Pereira SAM, Pereira EM, Marone M, Brandão RC, Soares Jr J, Andrada NC. Câncer Diferenciado da Tireóide: Diagnóstico 2011.
20. Ferraz C, Eszlinger M, Paschke R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):2016-26.
21. Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, et al. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. *World J Surg*. 2010 Jan;34(1):28-35.
22. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
23. Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 May 28;321(1):86-93.
24. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-50.
25. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal*. 2009 Apr;21(4):470-6.
26. Paes JE, Ringel MD. Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008 Jun;37(2):375-87, viii-ix.

27. Shinohara M, Chung YJ, Saji M, Ringel MD. AKT in thyroid tumorigenesis and progression. *Endocrinology*. 2007 Mar;148(3):942-7.
28. Testa JR, Tsichlis PN. AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7391-3.
29. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2006 Feb;30(2):216-22.
30. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2004 Sep 23;23(44):7436-40.
31. 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.
32. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003 Jul 17;22(29):4578-80.
33. Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*. 1993 Jun 11;260(5114):1658-61.
34. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. 1993 Jul 16;74(1):205-14.
35. Warne PH, Viciano PR, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*. 1993 Jul 22;364(6435):352-5.
36. Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, et al. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*. 1993 Jul 22;364(6435):308-13.
37. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):320-44.
38. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501.
39. Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid*. 2000 Jan;10(1):19-23.
40. Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999 Apr;50(4):529-35.
41. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Farr CJ, Hughes D, Padua RA, et al. Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res*. 1988 Aug 15;48(16):4459-63.
42. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, et al. High-Frequency of Ras Oncogene Activation in All Stages of Human Thyroid Tumorigenesis. *Oncogene*. 1989 Feb;4(2):159-64.
43. Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H, Motoi T, Machinami R. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract*. 2000;196(1):1-7.
44. Suarez HG, du Villard JA, Severino M, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, et al. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene*. 1990 Apr;5(4):565-70.
45. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, et al. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*. 1989 Feb;4(2):159-64.
46. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 1990 Oct;4(10):1474-9.
47. Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid*. 1996 Oct;6(5):409-16.
48. Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery*. 1994 Dec;116(6):1010-6.
49. Karga H, Lee JK, Vickery AL, Jr., Thor A, Gaz RD, Jameson JL. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Oct;73(4):832-6.
50. Vasko VV, Gaudart J, Allasia C, Savchenko V, Di Cristofaro J, Saji M, et al. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2004 Dec;151(6):779-86.
51. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Apr 16;95(8):625-7.

52. Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2005 Fall;16(3):163-72.
53. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005 Jun;12(2):245-62.
54. Nucera C, Goldfarb M, Hodin R, Parangi S. Role of B-Raf(V600E) in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-Raf(V600E). *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1795(2):152-61.
55. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev.* 2007 Dec;28(7):742-62.
56. Marchetti I, Lessi F, Mazzanti CM, Bertacca G, Elisei R, Coscio GD, et al. A morpho-molecular diagnosis of papillary thyroid carcinoma: BRAF V600E detection as an important tool in preoperative evaluation of fine-needle aspirates. *Thyroid.* 2009 Aug;19(8):837-42.
57. Moses W, Weng J, Sansano I, Peng M, Khanafshar E, Ljung BM, et al. Molecular testing for somatic mutations improves the accuracy of thyroid fine-needle aspiration biopsy. *World J Surg.* 2010 Nov;34(11):2589-94.
58. Sykorova V, Dvorakova S, Ryska A, Vcelak J, Vaclavikova E, Laco J, et al. BRAFV600E mutation in the pathogenesis of a large series of papillary thyroid carcinoma in Czech Republic. *J Endocrinol Invest.* 2010 May;33(5):318-24.
59. Oler G, Cerutti JM. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer.* 2009 Mar 1;115(5):972-80.
60. Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;93(10):3943-9.
61. Brzezianska E, Pastuszek-Lewandoska D, Wojciechowska K, Migdalska-Sek M, Cyniak-Magierska A, Nawrot E, et al. Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Neuro Endocrinol Lett.* 2007 Aug;28(4):351-9.
62. Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L, et al. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Aug;61(2):239-43.
63. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, et al. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Nov;63(5):588-93.
64. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell.* 2003 Oct;4(4):257-62.
65. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* 2005;94:29-86.
66. Kohn AD, Takeuchi F, Roth RA. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996 Sep 6;271(36):21920-6.
67. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31515-24.
68. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996 Dec 2;15(23):6541-51.
69. Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA, Hiles ID. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene.* 1999 Dec 23;18(56):8024-32.
70. Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8271-4.
71. Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):41189-96.
72. Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, et al. Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47720-5.
73. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 2006 Oct 6;127(1):125-37.
74. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 2004 May;29(5):233-42.

75. Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):523-7.
76. Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6105-11.
77. Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, et al. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet*. 2004 Mar;41(3):161-70.
78. Saji M, Vasko V, Kada F, Allbritton EH, Burman KD, Ringel MD. Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jun 24;332(1):167-73.
79. Bruni P, Boccia A, Baldassarre G, Trapasso F, Santoro M, Chiappetta G, et al. PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1. *Oncogene*. 2000 Jun 29;19(28):3146-55.
80. Miyakawa M, Tsushima T, Murakami H, Wakai K, Isozaki O, Takano K. Increased expression of phosphorylated p70S6 kinase and Akt in papillary thyroid cancer tissues. *Endocr J*. 2003 Feb;50(1):77-83.
81. Shin E, Hong SW, Kim SH, Yang WI. Expression of down stream molecules of RET (p-ERK, p-p38 MAPK, p-JNK and p-AKT) in papillary thyroid carcinomas. *Yonsei Med J*. 2004 Apr 30;45(2):306-13.
82. Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E, et al. Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization. *Am J Pathol*. 2005 Mar;166(3):737-49.
83. Larson SD, Jackson LN, Riall TS, Uchida T, Thomas RP, Qiu S, et al. Increased incidence of well-differentiated thyroid cancer associated with Hashimoto thyroiditis and the role of the PI3k/Akt pathway. *J Am Coll Surg*. 2007 May;204(5):764-73; discussion 73-5.
84. Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN, Sherman SI. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jan;93(1):278-84.
85. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009 Jun 1;69(11):4885-93.
86. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):439-44.
87. Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1161-70.
88. Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 31;103(5):1475-9.
89. Saji M, Narahara K, McCarty SK, Vasko VV, La Perle KM, Porter K, et al. Akt1 deficiency delays tumor progression, vascular invasion, and distant metastasis in a murine model of thyroid cancer. *Oncogene*. 2011 Oct 20;30(42):4307-15.
90. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009 Nov;19(11):1167-214.
91. Camargo R, Corigliano S, Friguglietti C, Gauna A, Harach R, Munizaga F, et al. Latin American thyroid society recommendations for the management of thyroid nodules. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009 Dec;53(9):1167-75.
92. Sobin LH WC. TNM classification of malignant tumors. 6th edition 2002.
93. De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPLEX Genotyping System. *Mutat Res*. 2005 Jun 3;573(1-2):111-35.
94. Livak KJ, Marmaro J, Todd JA. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat Genet*. 1995 Apr;9(4):341-2.
95. Harach HR, Ceballos GA. Thyroid cancer, thyroiditis and dietary iodine: a review based on the Salta, Argentina model. *Endocr Pathol*. 2008 Winter;19(4):209-20.
96. Imaizumi M, Usa T, Tominaga T, Neriishi K, Akahoshi M, Nakashima E, et al. Radiation dose-response relationships for thyroid nodules and autoimmune thyroid diseases in Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors 55-58 years after radiation exposure. *JAMA*. 2006 Mar 1;295(9):1011-22.

97. Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res.* 1995 Mar;141(3):259-77.
98. Williams ED, Doniach I, Bjarnason O, Michie W. Thyroid cancer in an iodide rich area: a histopathological study. *Cancer.* 1977 Jan;39(1):215-22.
99. Hamatani K, Eguchi H, Ito R, Mukai M, Takahashi K, Taga M, et al. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res.* 2008 Sep 1;68(17):7176-82.
100. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar;6(3):1093-103.
101. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004 Apr;30(2):193-204.
102. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Dec;4(12):937-47.
103. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Oda K, Okada J, Rauen K, McCormick F. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:461-7.
104. Kim MJ, Kang HG, Lee SY, Jeon HS, Lee WK, Park JY, et al. AKT1 polymorphisms and survival of early stage non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol.* 2012 Feb;105(2):167-74.
105. Hildebrandt MA, Yang H, Hung MC, Izzo JG, Huang M, Lin J, et al. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway are associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. *J Clin Oncol.* 2009 Feb 20;27(6):857-71.
106. Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet.* 2004 Feb;36(2):131-7.
107. Zhang X, Miao X, Sun T, Tan W, Qu S, Xiong P, et al. Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to risk of lung cancer. *J Med Genet.* 2005 Jun;42(6):479-84.
108. MacPherson G, Healey CS, Teare MD, Balasubramanian SP, Reed MW, Pharoah PD, et al. Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Dec 15;96(24):1866-9.
109. Park JY, Park JM, Jang JS, Choi JE, Kim KM, Cha SI, et al. Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Hum Mol Genet.* 2006 Jun 15;15(12):1963-71.
110. Harris SL, Gil G, Robins H, Hu W, Hirshfield K, Bond E, et al. Detection of functional single-nucleotide polymorphisms that affect apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8;102(45):16297-302.
111. Ide M, Ohnishi T, Murayama M, Matsumoto I, Yamada K, Iwayama Y, et al. Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia. *J Neurochem.* 2006 Oct;99(1):277-87.
112. Schwab SG, Hoefgen B, Hanses C, Hassenbach MB, Albus M, Lerer B, et al. Further evidence for association of variants in the AKT1 gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families. *Biol Psychiatry.* 2005 Sep 15;58(6):446-50.
113. Zai CC, Romano-Silva MA, Hwang R, Zai GC, Deluca V, Muller DJ, et al. Genetic study of eight AKT1 gene polymorphisms and their interaction with DRD2 gene polymorphisms in tardive dyskinesia. *Schizophr Res.* 2008 Dec;106(2-3):248-52.
114. Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, et al. Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population. *Biol Psychiatry.* 2004 Nov 1;56(9):698-700.
115. Xu MQ, Xing QH, Zheng YL, Li S, Gao JJ, He G, et al. Association of AKT1 gene polymorphisms with risk of schizophrenia and with response to antipsychotics in the Chinese population. *J Clin Psychiatry.* 2007 Sep;68(9):1358-67.
116. Dillon RL, Muller WJ. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4260-4.
117. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19;105(7):2652-7.
118. Bleeker FE, Lamba S, Zanon C, van Tilborg AA, Leenstra S, Troost D, et al. Absence of AKT1 mutations in glioblastoma. *PLoS One.* 2009;4(5):e5638.
119. Krzeslak A, Pomorski L, Lipinska A. Expression, localization, and phosphorylation of Akt1 in benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol.* 2011 Dec;22(4):206-11.

120. Sozopoulos E, Litsiou H, Voutsinas G, Mitsiades N, Anagnostakis N, Tseva T, et al. Mutational and immunohistochemical study of the PI3K/Akt pathway in papillary thyroid carcinoma in Greece. *Endocr Pathol*. 2010 Jun;21(2):90-100.
121. Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jun;88(6):2745-52.
122. Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, et al. The Associations Between RAS Mutations and Clinical Characteristics in Follicular Thyroid Tumors: New Insights from a Single Center and a Large Patient Cohort. *Thyroid*. 2012 Jul;22(7):683-9.
123. Rivera M, Ricarte-Filho J, Knauf J, Shaha A, Tuttle M, Fagin JA, et al. Molecular genotyping of papillary thyroid carcinoma follicular variant according to its histological subtypes (encapsulated vs infiltrative) reveals distinct BRAF and RAS mutation patterns. *Mod Pathol*. 2010 Sep;23(9):1191-200.
124. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3226-35.
125. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Nov;88(11):5399-404.
126. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 May;89(5):2414-20.
127. Nucera C, Lawler J, Parangi S. BRAF(V600E) and microenvironment in thyroid cancer: a functional link to drive cancer progression. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2417-22.
128. 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.
129. Nucera C, Porrello A, Antonello ZA, Mekel M, Nehs MA, Giordano TJ, et al. B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 8;107(23):10649-54.
130. Wang Y, Ji M, Wang W, Miao Z, Hou P, Chen X, et al. Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Mar;15(1):183-90.
131. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2012 Apr 1;118(7):1764-73.
132. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6373-9.
133. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, et al. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Sep;65(3):364-8.
134. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Nov;92(11):4085-90.
135. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M, Lupi C, Sensi E, et al. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Sep;95(9):4197-205.
136. Pelttari H, Schalin-Jantti C, Arola J, Loyttyniemi E, Knuutila S, Valimaki MJ. BRAF V600E mutation does not predict recurrence after long-term follow-up in TNM stage I or II papillary thyroid carcinoma patients. *APMIS*. 2012 May;120(5):380-6.
137. Romei C, Fugazzola L, Puxeddu E, Frasca F, Viola D, Muzza M, et al. Modifications in the Papillary Thyroid Cancer Gene Profile Over the Last 15 Years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jun 28.
138. Soares P, Sobrinho-Simoes M. Is BRAF mutation screening useful for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer? *Future Oncol*. 2009 Oct;5(8):1225-9.

Anexo 1

São Paulo, 09 de Setembro de 2010.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

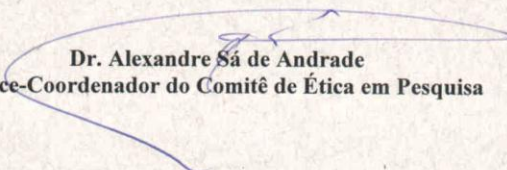
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1426/10
“Identificação de possíveis mutações do gene PI3KCA e AKT3 em pacientes com câncer de tireóide”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 31/08/2010, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 10/08/2010, aprovaram a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Certificado de Recebimento da proposta de fomento pela FAPESP;
- Documento de concessão de Fomento pela FAPESP;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Lista de centros participantes da pesquisa;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1426/10

Título: "Identificação de possíveis mutações do gene PI3KCA e AKT3 em pacientes com câncer de tireóide".

Pesquisador Responsável: Dr. Fernando Augusto Soares

Orientador na Instituição Vinculada: Dra. Laura Sterian Ward

Aluna: Aline Carolina De Nadai da Silva (Mestrado - UNICAMP).

Patrocinador: Projeto submetido para FAPESP – 2010/08665-3.

Comentários gerais: O projeto tem como objetivo avaliar mutação no gene PI3KCA para testar seu potencial de marcador para detecção precoce do câncer ou de acompanhamento da progressão do tumor. O tema é relevante e o projeto bem delineado.

Pendências apontadas em parecer anterior (CEP):

Crêterios de exclusão: Não mencionados.

Análise do CEP: Os critérios de exclusão foram acrescentados no projeto. **Pendência atendida.**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Trata-se de um projeto retrospectivo. No entanto está declarado no texto do projeto que os pacientes assinarão o TCLE. A recomendação é retirar a frase "Todos os pacientes assinarão o Termo de Consentimento Informado de acordo com as normas Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo".

Análise do CEP: Foi retirada a frase do TCLE sugerida por este Comitê. **Pendência atendida.**

Explicitação das responsabilidades:

- do pesquisador: Não foi apresentado a carta de ciência e comprometimento do biobanco.
- do patrocinador: Não mencionado.

Análise do CEP: A carta de Ciência e Comprometimento do Biobanco foi apresentada e também o documento de concessão de Fomento pela FAPESP. **Pendência atendida.**

Comentários Finais:

Todas as pendências apontadas foram atendidas a contento, portanto, decidimos pela aprovação final do projeto.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice - Coordenador

Parecer Referente à Reunião do CEP de 31/08/2010.

1/1

Anexo 2



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 27/01/10.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 961/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0747.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-APOPTÓTICA DE NF-κB EM PACIENTES COM CÂNCER DE TIREÓIDE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Aline Carolina de Nadai da Silva

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/10/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/01/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Identificar mutações nos éxons 9 e 20 do gene *PI3K* e analisar a expressão quantitativa de NF-κB, comparando-a com a expressão de PTEN em pacientes com nódulos tireoidianos benignos e malignos.

III - SUMÁRIO

O presente estudo pretende avaliar 100 sujeitos com câncer diferenciado de tireóide, atendidos na Disciplina de Endocrinologia do HC/Unicamp. Os métodos incluem a coleta de dados clínico-laboratoriais (identificação, idade ao diagnóstico, gênero, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos, dieta, tabagismo, uso de medicamentos e drogas, bem como exames complementares realizados e dados da cirurgia e do exame anatomopatológico). Também será formado um grupo controle composto por 100 indivíduos saudáveis, pareados por gênero, idade e etnia, dos quais serão obtidos históricos incluindo fatores demográficos, étnicos, estilo de vida, hábitos alimentares, condições gerais de saúde, tabagismo e histórico de doenças. No grupo controle também haverá coleta de 9 mL de sangue periférico para estudos moleculares e proteômicos. Indivíduos com histórico prévio de doenças tireoidianas, exposição à radiação ou outros antecedentes de malignidade serão excluídos desse grupo. Dos pacientes com CDT será extraído RNA a partir de amostras cirúrgicas (tireoidectomia), para posterior transcrição reversa para síntese de cDNA e quantificação por RT-PCR. Será realizado sequenciamento do DNA extraído de tumor tireoidiano por equipamento automatizado. Haverá revisão dos espécimes cirúrgicos conservados em bloco de parafina para confirmação do diagnóstico, análise de parâmetros anatomopatológicos, estudo imunoistoquímico e reação da imunoperoxidase.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após avaliar as respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de outubro de 2009.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE de COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

CA DE TIRÓIDE – ENDOCRINOLOGIA

Nome:

HC:

Sexo: ☐ Masc. ☐ Fem.

Cor: ☐ Branco ☐ Não Branco

Profissão:

Procedência:

Data de Nasc. ____ / ____ / ____

Idade no Diagnóstico:

Data 1ª consulta: ____ / ____ / ____

Motivo da Consulta: ☐ Nódulo ☐ Bócio MN ☐ Outros _____

Valores: T3 T4 LT4 TSH AcMc AcTG

Tireotepaia na Família: ☐ Não ☐ Sim Descrever: _____

Câncer na família: _____

Radiação do Pescoço: ☐ Não ☐ Sim Motivo: _____

Tabagismo: ☐ Não ☐ Sim ____ nº cig/dia ____ tempo ____ parou/tempo

Etilismo: ☐ Não ☐ Sim

Idade da Menarca: **Ciclos** ____ regulares **ACO** (tempo)

Idade da Menopausa: **G** ____ **A** ____ **P** ____ **TRH**

Cintilografia: ____ / ____ / ____

Ultrassom: ____ / ____ / ____

BAAF ____ / ____ / ____ nº da cito **Diagnóstico:**

Cirurgia: ____ / ____ / ____ **Unicamp:** ☐ Sim ☐ Não Local: _____

Peso: _____ **Altura:** _____

CONGELAÇÃO

Anátomo Patológico: ____ / ____ / ____ Nº

Tam. Nódulo:

Diagnóstico:

PCI: ____ / ____ / ____

Dose Radioiodo: ____ / ____ / ____ mCi

Data										
Tg										
AcTg										
LT4										
TSH										
Dose Med.										

PCI: ____ / ____ / ____

Data										
Tg										
AcTg										
LT4										
TSH										
Dose Med.										

