Antonio Augusto Tupinambá Bertelli

MUTAÇÃO BRAF EM PACIENTES IDOSOS SUBMETIDOS À TIREOIDECTOMIA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina

Área de Concentração: Cirurgia Geral
Orientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves

São Paulo
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Bertelli, Antonio Augusto Tupinambá
Mutação BRAF em pacientes idosos submetidos à tireoidectomia./ Antonio Augusto Tupinambá Bertelli. São Paulo, 2010.
Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.
Área de Concentração: Cirurgia Geral
Orientador: Antonio José Gonçalves

1. Glândula tireóide 2. Tireoidectomia 3. Neoplasias da glândula tireóide 4. Proteínas proto-oncogênicas B-raf 5. Mutação 6. Idoso

BC-FCMSCSP/79-10

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Antonio de Pádua Bertelli, exemplo de ser humano e médico, que dedicou a vida à sua família e ao combate ao câncer e teve a sua ceifada rápida e precocemente por ele, deixando muitas saudades e um vazio impreenchível.

À minha mãe, Edna, e às minhas irmãs Ana Lúcia, Daniela e Maria Cristina, que sempre me apoiaram quando mais precisei, entendendo minha constante ausência.

À minha esposa, Carla, pela paciência, companheirismo e amor incondicionais.

FRASE

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,

qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

À Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e à Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, verdadeiros berços do conhecimento médico, às quais devo toda a minha formação profissional, sem a qual este estudo não seria possível.

Ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelo acolhimento e apoio constantes.

À Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, todos os seus membros e colaboradores, inclusive ex-residentes e pós-graduandos, pela ajuda nas horas de tempestade.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, sem a qual este sonho não teria se concretizado.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro prestado em parte deste estudo.

Ao Prof. Dr. Antonio J. Gonçalves, Chefe da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, exemplo ímpar de liderança e dedicação, cuja paciência e

didática são dignas de um verdadeiro Mestre, por sempre tentar me auxiliar a trilhar o caminho mais curto em minha vida acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Marcelo Benedito Menezes, Professor Assistente da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, exímio cirurgião e companheiro nas horas difíceis, pela constante orientação e amizade.

Ao Dr. Luiz Cláudio Bosco Massarollo, Membro Efetivo da Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, ex-aluno da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, o verdadeiro irmão mais velho que nunca tive, pela idéia que criou o embrião deste estudo e pelos momentos inestimáveis compartilhados.

Ao Dr. Norberto Kodi Kavabata, Professor Instrutor da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelos conceitos defendidos.

Ao Dr. Alexandre Babá Suehara, Médico Assistente da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelos conselhos e apoio cedido.

Ao Dr. Erivelto Martinho Volpi, Membro Efetivo da Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, exemplo de profissionalismo, amizade e perspicácia.

Aos Profs. Drs. Fares Rahal, Vitor Pereira e João Fava, meus professores desde a época da graduação, a quem sempre admirei como um fã a ídolos, mesmo que em silêncio.

Ao Prof. Dr. Luiz Arnaldo Szutan, Chefe do Grupo de Fígado e Hipertensão portal do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Diretor do Curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, exemplo de dedicação ao paciente e conduta ética.

Aos Profs. Drs. Rodrigo Altenfelder Silva, Danilo Gagliardi, Armando de Ângelo Casaroli, Sílvia Cristine Soldá, José Cesar Assef e Jacqueline Arantes Giannini Perlingeiro, exemplos de brilhantismo na carreira médico-cirúrgica, meus professores no início de minha vida profissional e atuais companheiros de dia a dia.

Aos amigos Dr. Fernando Leal Pereira, Dr. Maurício Alves Ribeiro, Dr. Alexandre Shinitti Sassatani, Dr. Caio Gustavo Gaspar de Aquino, Dr. Caio Cesar Martins Focassio e Dr. Mauro Prado, colegas de profissão e amigos do dia a dia, pela compreensão e ajuda em todas as fases deste estudo.

Ao Dr. Eduardo Ramos de Andrade Neto (Edu Bala), meu grande irmão e mentor espiritual, sempre presente, paciente e acolhedor.

Ao Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, principalmente ao Prof. Dr. Dino Martini Filho, chefe deste departamento, Dr. Mauro Ajaj Saieg e Dra. Maria Fernanda Carriel Amary, médicos

assistentes deste departamento e Sr. Francisco, técnico deste departamento, pelo incansável auxílio em partes deste estudo.

Ao Laboratório de Biologia molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, principalmente ao Prof. Dr. Murilo Rezende Melo, médico assistente deste laboratório, e Sr. Flávio Richeti, técnico deste laboratório, pela presteza no auxílio da metodologia.

À Prof. Dra. Edna T. Kimura, chefe do Laboratório de Biologia Molecular da Tiróide do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, cientista pioneira no estudo do BRAF no mundo, pela gentileza de auxiliar na metodologia deste estudo.

À Prof. Dra. Karina de Cássia Braga Ribeiro, professora assistente do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelo auxílio na estatística deste estudo, e pela presteza de sua execução.

A Srta. Deise Martins de Almeida Carvalho, secretária da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelo auxílio prestado em todas as fases deste estudo.

A todos os amigos, familiares, funcionários e colegas, que mesmo não citados aqui, contribuíram de uma forma ou de outra para a realização desta dissertação.

Por fim, a todos os nossos pacientes, nosso bem maior e principal objetivo de nossos estudos.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RET: *rearranged during transfection proto-oncogene*

PTC: PTC - *papillary thyroid carcinoma*

RAF: *RAF-Rapidly growing fibrosarcomas*

BRAF: o gene da RAF quinase do tipo B

Mutação BRAF: mutação ativadora do oncogene BRAF

BRAFm: presença da mutação BRAF

BRAF-: ausência da mutação BRAF

MAP quinase: *mitogen activated protein*

DNA: ácido desoxirribonucléico

GNDF: *glial cell-derived neurotropic factor*

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

PCR-ARMS: Amplification Refractory Mutation System

PCR-RT: PCR em tempo-real

Taq polimerase: *Thermus aquaticus*

Tm: *melting temperature*, temperatura de dissociação

TT: tireoidectomia total

HEMI: hemitireoidectomia

TSUB: tireoidectomia subtotal

IST: istmectomia

TUMORE: tumorectomia

Cec: carcinoma epidermóide

Ca folicular: carcinoma folicular

Ca indif: carcinoma indiferenciado ou anaplásico

Ca medular: carcinoma medular

Ca papilífero: carcinoma papilífero

SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 1
2. **OBJETIVOS** 14
3. **CASUÍSTICA E MÉTODO** 16
4. **RESULTADOS** 26
5. **DISCUSSÃO** 32
6. **CONCLUSÕES** 39
7. **ANEXOS** 41
8. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 45

RESUMO 52

ABSTRACT 53

APÊNDICE 54

INTRODUÇÃO

O Carcinoma Papilífero é a neoplasia endócrina mais comum, com uma incidência anual de 2 a 4 por 100.000 indivíduos[1], pertence ao grupo dos chamados carcinomas bem diferenciados de tireóide, é oriundo da célula folicular tireoideana e acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva[2]. Após os 70 anos de idade, sua incidência é igual entre ambos os sexos, e existe uma forte associação entre o aumento da idade e um pior prognóstico[3-8].

Recentemente, muitos estudos têm observado os eventos moleculares que levam à transformação maligna da célula folicular tireoideana. No carcinoma papilífero destacam-se (figura 1)[7]:

1) as translocações e inversões que causam a recombinação do gene RET (*rearranged during transfection proto-oncogene; MIM 164761*) com genes heterólogos, dando origem ao gene quimérico RET/PTC (PTC - *papillary thyroid carcinoma*).
2) as mutações ativadoras e translocações do gene BRAF (*RAF-Rapidly growing fibrosarcomas*).
3) as mutações do gene RAS[9].

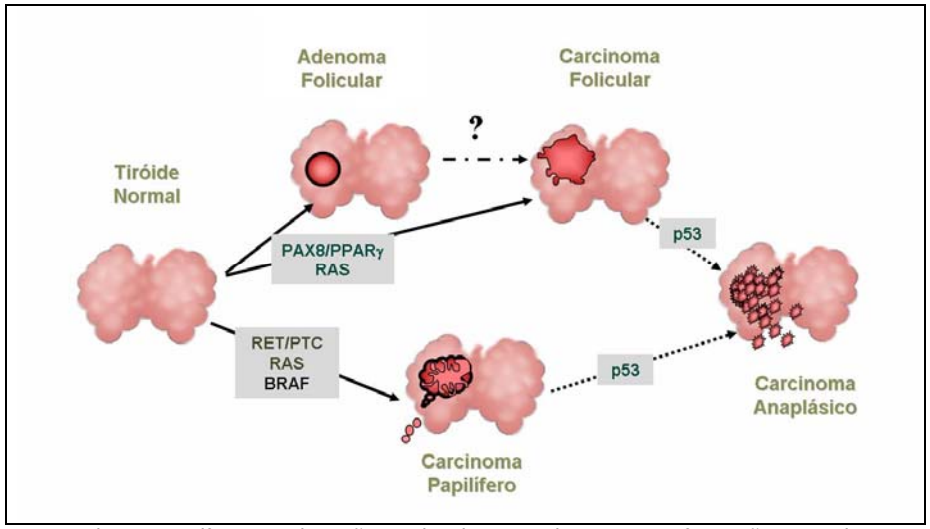


Figura 1 – Diferentes alterações moleculares que levam a transformação tumoral da celular folicular tireoideana[10].

Todas essas alterações genéticas interferem na via da MAP quinase (*mitogen activated protein*), que estimula a proliferação desordenada da célula folicular originando a neoplasia[11-15]. A via da MAP quinase tem um papel importante na proliferação, diferenciação e apoptose celular[13, 16-18].

A cirurgia da tireóide no paciente idoso deve ser realizada com os mesmos princípios e indicações do paciente jovem, graças a uma morbi-mortalidade baixa, quando realizada por mãos experientes[5, 6, 19-24]. O câncer da tireóide é comum entre os idosos, representando um terço das desordens tireoideanas, em pacientes acima dos 80 anos, comparado a uma incidência de 6 a 8% entre a quarta e quinta décadas de vida[3, 4, 25]. Além de sua maior incidência, o câncer de tireóide também possui uma maior gravidade no idoso, devido a presença comum de fatores de pior prognóstico como extravasamento capsular, invasão vascular, histologia folicular e indiferenciada (carcinoma anaplásico) além da idade como um fator independente de mau prognóstico[4, 26-28].

A idade é o maior fator de risco para o desenvolvimento de uma neoplasia e mais de 50% dos tumores em geral acometem pacientes com mais de 65 anos de idade[4]. O envelhecimento da população mundial é fato incontestável e vem ocorrendo tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento[6, 21, 22, 29]. Estima-se que em 2025, o Brasil terá a sexta maior população de idosos do mundo, e a faixa de maior crescimento será daqueles com mais de 80 anos[30].

A) Conceitos em biologia molecular

Os tumores se desenvolvem a partir de células que sofrem alterações através de danos genéticos herdados ou adquiridos, transferidos às células filhas. Assim, nasce um clone de células capaz de se multiplicar e resistir aos mecanismos de defesa do organismo (figura 2)[31]. Tais danos genéticos podem ser causados por eventos químicos (ex: benzeno), agentes físicos (ex: radiação ultravioleta e ionizante) ou agentes biológicos (ex: papilomavírus).

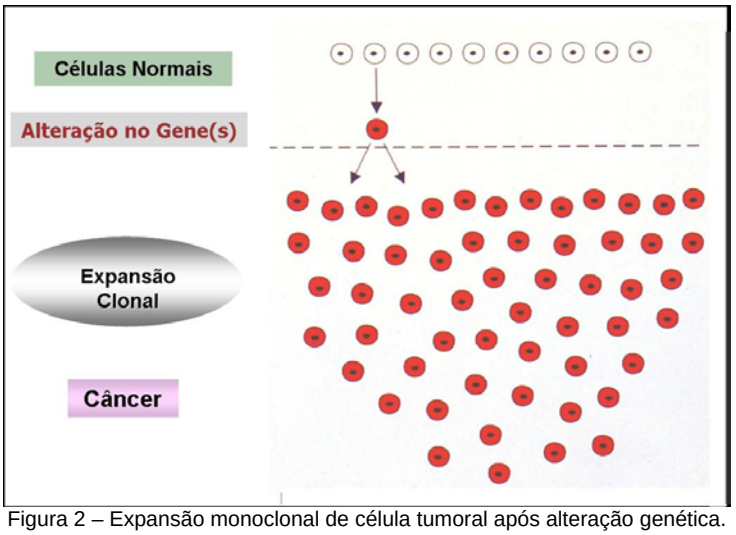


Figura 2 – Expansão monoclonal de célula tumoral após alteração genética.

As anormalidades que acometem os genes estimuladores da divisão celular (oncogenes) e os genes que bloqueiam a divisão celular (supressores tumorais) podem conferir à célula vantagens no crescimento e desenvolvimento[32]. Podem ainda ocorrer danos nos genes que controlam o tempo de vida ou a morte celular, como o gene da telomerase, os genes envolvidos na apoptose[33] e os genes de reparo do DNA, como o P53[34]. Quanto mais tempo uma célula viver, maior será a chance de adquirir mutações vantajosas para crescimento e diferenciação. Além disso, para que um tumor progrida localmente ou através de metástases é necessário que as células tenham a capacidade de angiogênese, invasão de células

vizinhas, vencer barreiras, embolizar, sobreviver aos ataques do sistema imunológico, aderir ao leito capilar e extravasar para o tecido distante, além de se multiplicar em um ambiente hostil. Todos estes fatores dependem da ativação e/ou da desativação de uma série de genes[32]. Quando uma célula sofre grandes danos em seu DNA, que sobrepujam sua capacidade de reparação, está sujeita à instabilidade genômica, ou seja, pode sofrer alterações grosseiras como translocações, amplificações, ou mesmo perda de material cromossômico. Assim, com o genoma instável, novas anormalidades poderão ocorrer com a divisão celular, aumentando a chance de desenvolvimento do câncer[17, 32].

B) Biologia Molecular da célula tireoideana

O gene RET está localizado no cromossomo 10q11.2 e codifica um receptor transmembrana com atividade tirosina-quinase que se expressa nos tecidos oriundos das células da crista neural e das células uro-genitais. Ele codifica a proteína RET, que é composta pelo domínio extracelular, o domínio transmembrana e o domínio intracelular, este último rico em atividade enzimática da tirosina-quinase. Seu domínio extracelular atua como receptor do fator de crescimento neurotrófico derivado de células da glia (GNDF-*glial cell-derived neurotropic factor*), responsável pela sua ativação, induzindo diferentes vias de sinalização intracelulares, dependendo da tirosina-quinase envolvida. As fosforilações de tirosinas e combinações com efetores intracelulares levam a ativação da via da MAP quinase (Figura 3)[7], que é a via mais importante envolvida na gênese do carcinoma papilífero da tireóide, e pode ser ativada pela mutação BRAF.

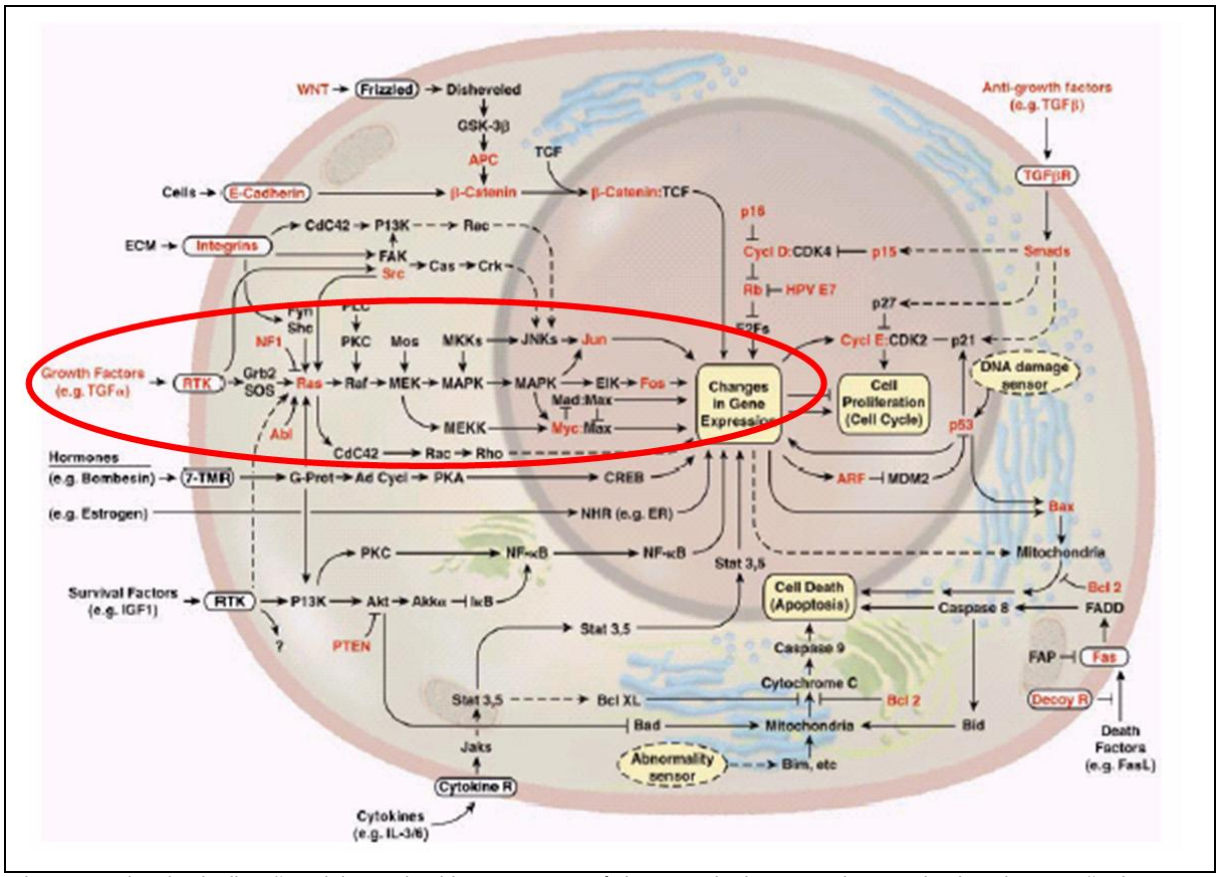


Figura 3 – Vias de sinalização celular conhecidas como oncogênicas – a via da MAP quinase, ativada pela mutação do BRAF, (assinalada em vermelho) é estimulada por fatores de crescimento e promove a proliferação celular.

Quanto à tumorigênese da célula tireoideana, as células parafoliculares, derivadas da crista neural, só expressam o gene RET durante a fase embrionária, mas as mutações ativadoras do RET na fase adulta levam à forma familiar do carcinoma medular. Já as células foliculares não expressam o gene RET[35]; entretanto várias alterações genéticas exercem sua atividade oncogênica, ao menos parcialmente, através da via RET/PTC – RAS – RAF – MAP quinase / ERK quinase [7] (Figura 4), levando à formação do carcinoma papilífero.

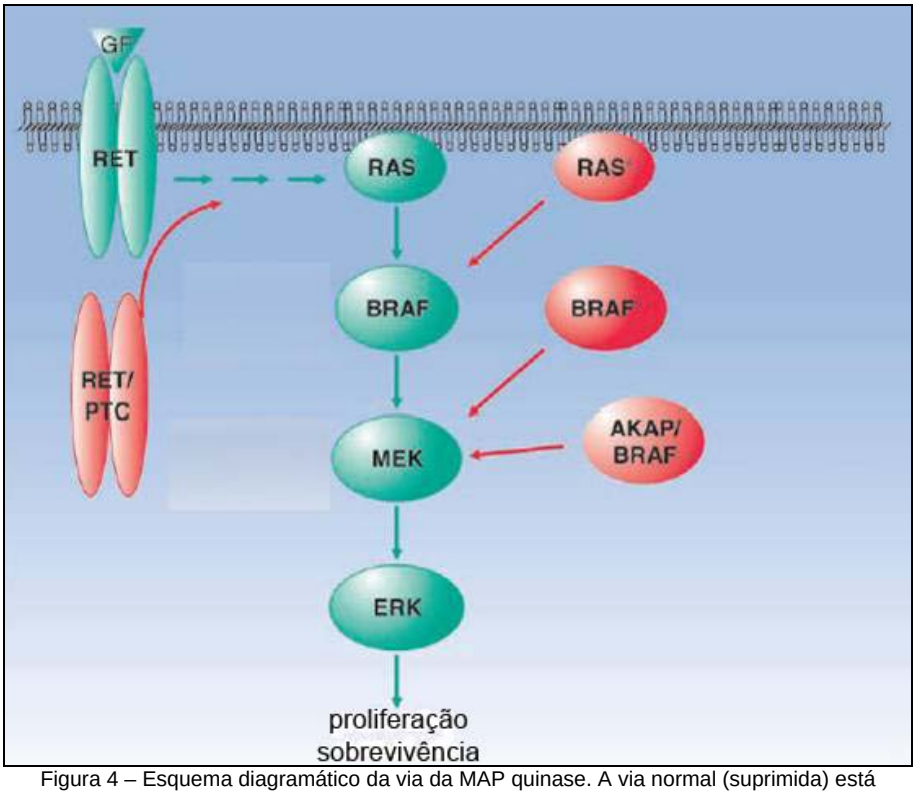


Figura 4 – Esquema diagramático da via da MAP quinase. A via normal (suprimida) está representada em verde, onde GF representa o fator de crescimento, enquanto a ativação da via através de mutações está representada em vermelho[36].

C) A mutação BRAF

Existem três formas de RAF quinases (ARAF, BRAF e CRAF). O BRAF se localiza no cromossomo 7, e é o mais potente ativador da via MAP quinase. Abaixo, um esquema das três proteínas do sistema RAF (Figura 5)[37].

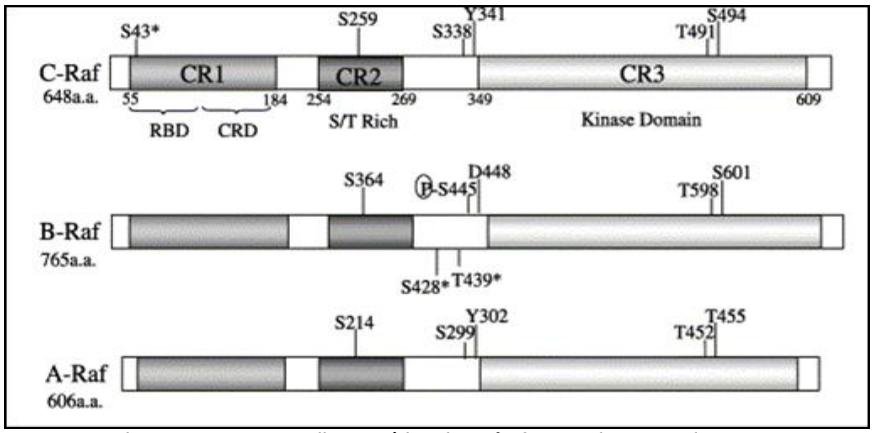


Figura 5 – Esquema diagramático das três formas de RAF quinases.

As mutações pontuais ativadoras do BRAF no domínio quinase se localizam nos exons 11 e 15 do gene e a transversão T1799A representa mais de 80% de todas as mutações BRAF. Esta mutação foi inicialmente denominada T1796A, baseada na seqüência de nucleotídeos do GenBank NM 004333, na qual faltava um códon (3 nucleotídeos) no exon 1 do gene BRAF. Com a versão correta da seqüência de nucleotídeos do GenBank NT 007914 disponível, esta mutação do BRAF é chamada de T1799A[7]. A mutação T1799A resulta em substituição do aminoácido V600E (formalmente chamada de V599E) no produto protéico e subseqüente ativação da BRAF quinase (Figura 6)[38].

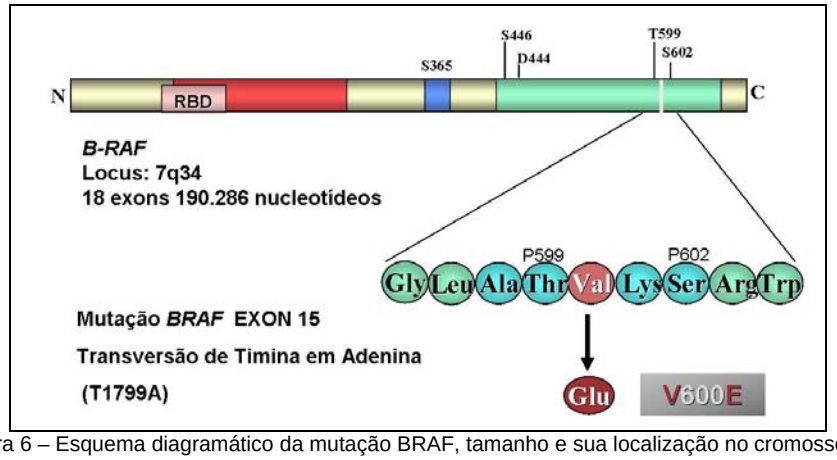


Figura 6 – Esquema diagramático da mutação BRAF, tamanho e sua localização no cromossomo. Abaixo, à direita, a alteração na proteína quinase resultante (substituição de uma valina por um glutamato na posição 600).

Excetuando a mutação K601E encontrada em um adenoma folicular e quatro carcinomas papilíferos de variante folicular, o rearranjo do gene AKAP9-BRAF (descrito em um carcinoma papilífero esporádico e três associados com a radiação), a deleção de três nucleotídeos (K601del) encontrada em linfonodos metastáticos de um carcinoma papilífero de variante sólida, e a inserção de três nucleotídeos (V599Ins) encontrada em um carcinoma papilífero de variante clássica, a mutação BRAF V600E é a única encontrada frequentemente no carcinoma papilífero de tireóide[39, 40]. Esta mutação é de extrema importância porque o aminoácido valina

localizado na posição 600 contribui significativamente para a estabilização da conformação inativa do domínio da BRAF quinase. A substituição da valina pelo glutamato causa desestabilização desta conformação inativa, promovendo um estado de ativação, aumentando a atividade da BRAF quinase através de MEK[40] (Figura 4).

Desde a sua descoberta as mutações BRAF têm sido relatadas em vários tipos de tumores, com freqüências variáveis, sendo as mais prevalentes em melanomas e em nevus[41]. Recentemente, importantes estudos têm demonstrado as mutações BRAF no câncer da glândula tireóide, com uma prevalência apenas inferior à do melanoma[37]. As mutações BRAF (o gene da RAF quinase do tipo B) representam a alteração genética mais comum do câncer de tireóide e esta foi a descoberta mais notável neste campo de pesquisa, nos últimos anos[42]. O descobrimento destas alterações criou inclusive a oportunidade do desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para o câncer da tireóide.[13, 16, 43-46].

D) Mutação BRAF e câncer de tireóide

As mutações BRAF estão presentes em 23-83% dos carcinomas papilíferos (figura 7) e são altamente específicas para este tipo histológico [9, 37, 38, 47-49]. Kimura e cols, em um estudo pioneiro publicado em 2003, demonstraram que a mutação BRAF ocorre em 32,8% dos carcinomas papilíferos, não ocorre em lesões benignas ou foliculares, e quando presente não se sobrepõe com outras mutações de RAS ou de rearranjo do RET/PTC. Estes fatos apontam à via da MAP quinase como a principal responsável pela gênese do carcinoma papilífero[37, 50, 51].

Os rearranjos do RET/PTC são comuns em carcinomas papilíferos associados com radiação ionizante[8, 52], enquanto que as mutações BRAF parecem menos freqüentes nestes tumores[49], assim como em crianças expostas ou não a radiação[8, 53].

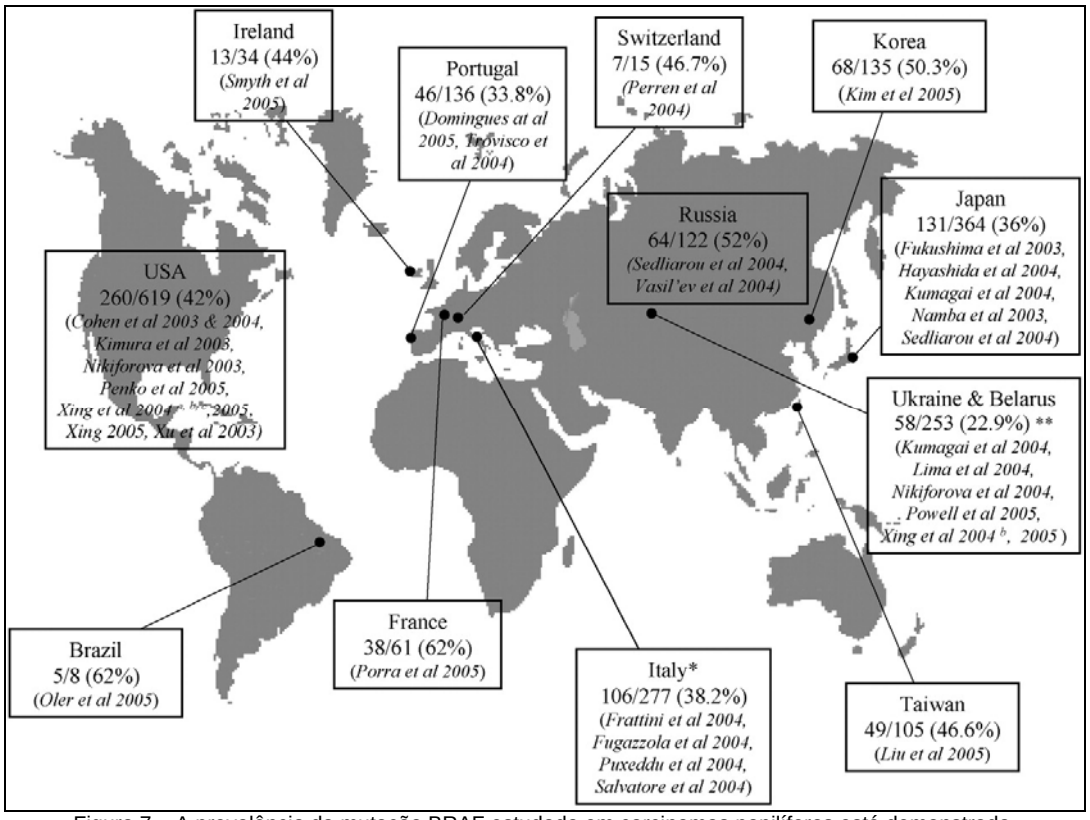


Figura 7 – A prevalência da mutação BRAF estudada em carcinomas papilíferos está demonstrada, agrupando dados de um mesmo país. A prevalência calculada é de 39,6% (845 de 2129 casos)[49]
*os dados italianos não incluem os dados de Fugazzola e cols;
**a maioria dos pacientes estudados era de crianças.

Nikiforova e cols[54], em 2003, estudaram 320 lesões de tireóide benignas e malignas (104 carcinomas papilíferos, 32 carcinomas foliculares,12 carcinomas pouco diferenciados, 11 carcinomas anaplásicos, 13 carcinomas medulares, 46 adenomas foliculares e 65 nódulos hiperplásicos), confirmando a ausência da mutação BRAF em lesões benignas, carcinomas medulares e foliculares. E pela primeira vez, observaram que a mutação BRAF, atribuída até então como exclusiva do carcinoma papilífero, ocorria também em carcinomas

pouco diferenciados e anaplásicos. Sugeriram ainda, que tais carcinomas menos diferenciados BRAFm se originavam a partir de carcinomas papilíferos[49, 55].

O carcinoma anaplásico acomete principalmente pacientes idosos com bócios ou carcinomas bem diferenciados não tratados e com longa evolução. Um exame histopatológico cuidadoso revela que muitos carcinomas anaplásicos possuem áreas de carcinoma papilífero ou folicular[56]. Ele se origina a partir do epitélio folicular tireoideano, e pode representar uma indiferenciação dos carcinomas bem diferenciados. Alguns autores têm demonstrado a transformação do carcinoma papilífero em carcinoma anaplásico através de evidências moleculares, onde a mutação ativadora do oncogene BRAF (mutação BRAF) e a inativação do P53 desempenham um importante papel (Figura 1)[38, 41, 54, 57].

A patogênese dos tumores pouco diferenciados e anaplásicos da tireóide e sua possível associação com tumores bem diferenciados pré-existentes tem sido discutida há muito tempo, e já existia evidência histológica da transformação: carcinomas bem diferenciados → carcinomas pouco diferenciados → carcinomas anaplásicos[56, 58]. Entretanto, havia pouca evidência desta transformação em níveis moleculares. Nikiforova e cols demonstraram que esta transformação pode ser favorecida pela mutação BRAF[54].

O carcinoma papilífero possui algumas variantes histológicas que também foram estudadas quanto à presença da mutação BRAF. A variante clássica e a variante de células altas (relacionada com maior agressividade) parecem apresentar uma maior incidência da mutação BRAF. Já a variante folicular apresenta tal

mutação mais raramente, e os microcarcinomas (tumores menores que 1,0cm) podem apresentar a mutação BRAF, o que confirma a hipótese de que ela pode ocorrer no início da gênese tumoral do carcinoma papilífero[54].

Quanto ao prognóstico, esta mutação pode aparecer precocemente em carcinomas papilíferos pequenos, mas acredita-se que os carcinomas papilíferos com mutações BRAF possuem com maior freqüência, fatores de pior prognóstico, como variantes mais agressivas (ex: células altas), extravasamento da tireóide, estádio clínico mais avançado, metástases à distância e ainda podem estar relacionadas com o carcinoma anaplásico. Estes dados indicam que tumores com este genótipo possuem um prognóstico pior[1, 38, 47, 54, 59-63].

Uma correlação entre a idade avançada e a presença da mutação BRAF em carcinomas papilíferos foi demonstrada[54, 64], e recentemente, uma baixa freqüência desta foi observada em crianças[53, 60, 65]. Atualmente, nenhuma outra associação inequívoca foi estabelecida entre o genótipo e alterações clínico-patológicas do carcinoma papilífero[49]. Alguns estudos demonstraram uma correlação entre a mutação BRAF e o estadiamento avançado, metástases linfonodais, metástases à distância e recorrência do tumor[1, 16, 47, 54, 63, 66].

Xing e cols (2005) demonstraram que a mutação BRAF é um fator preditivo independente de recorrência tumoral, mesmo em pacientes com estadio I e II[66]. Ademais, as mutações BRAF também têm sido relacionadas à baixa captação de iodo 131 no pós-operatório, assim como à falha do tratamento da doença recidivada[67]. Entretanto, Trovisco e cols[64], entre outros[40, 49, 68, 69], não

demonstraram associação da mutação BRAF com um pior prognóstico. Fugazzola e cols [(49)], estudando 260 carcinomas papilíferos, demonstraram uma associação com significância estatística entre a mutação BRAF e idade avançada ao diagnóstico, sem correlação com um pior prognóstico ou pior evolução, com seguimento médio de 72 meses. Ito e cols, em 2009[(69)], estudaram, 631 pacientes com carcinoma papilífero e seguimento médio de 83 meses, e também falharam em demonstrar um pior prognóstico associado com a mutação BRAF (Figura 8).

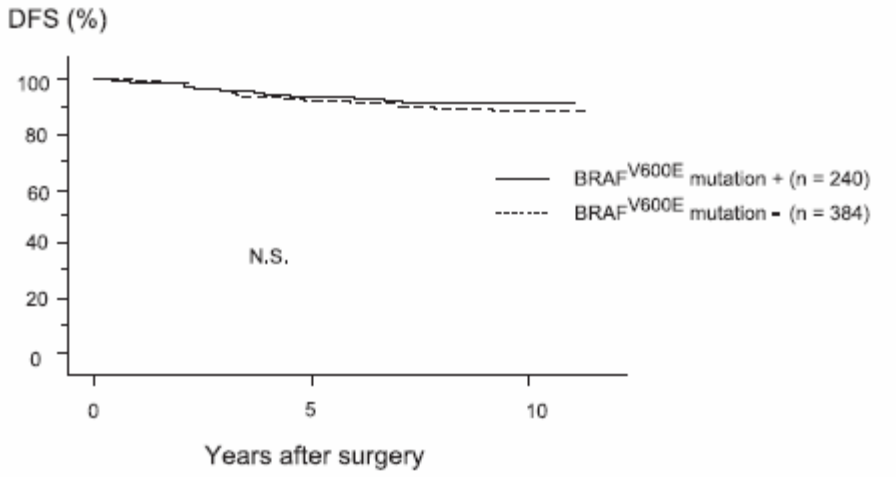


Figura 8 – Curvas de Sobrevida livre de doença de Kaplan-Meier de pacientes com carcinoma papilífero com a presença e a ausência da mutação BRAF. N.S.: Não-significante; DFS: Sobrevida livre de doença[(69)].

Assim, a mutação BRAF representa uma importante descoberta para a pesquisa do câncer da tireóide; e é a mutação mais freqüente do carcinoma papilífero, tipo histológico mais comum entre as neoplasias da tireóide. Como não existem estudos com análise multivariada ou com casuística e tempo de seguimento suficientes, não está claro se a mutação do BRAF está relacionada a um pior prognóstico, ou apenas ocorre em indivíduos idosos nos quais outros fatores são responsáveis pelo mau prognóstico[(8, 53, 70, 71)]. Também não existe na literatura mundial, que seja de nosso conhecimento, um estudo da mutação BRAF específico em idosos.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar a freqüência da mutação V600E do gene BRAF em pacientes com mais de 65 anos submetidos à tireoidectomia, correlacionar sua presença ou ausência com as diferentes lesões histológicas, com suas diferentes variantes e fatores prognósticos do carcinoma papilífero.

CASUÍSTICA E MÉTODO

CASUÍSTICA

Foi realizado um estudo retrospectivo entre 1994 e 2009 selecionando todos os pacientes com mais de 65 anos submetidos a qualquer tipo de cirurgia sobre a glândula tireóide pela Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição sob o número 116/07.

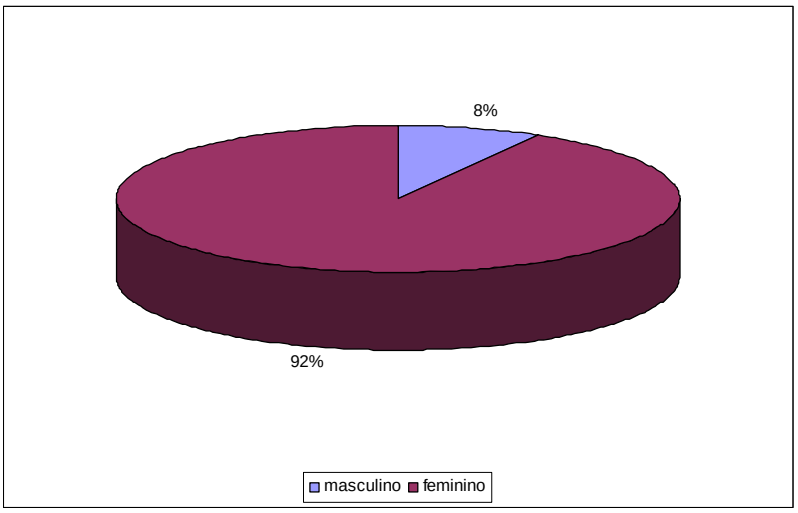
Uma revisão no banco de dados eletrônico da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo identificou 104 pacientes com mais de 65 anos e que haviam sido submetidos a algum tipo de cirurgia sobre a glândula tireóide. Destes 104, quatro pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem tumores primários de outras regiões, como paratireóide, orofaringe e laringe, com invasão de glândula tireóide. Dos 100 restantes, 15 apresentaram dados incompletos em prontuário ou inexistência de tecido suficiente em blocos de parafina para a extração de DNA, sendo então excluídos deste estudo.

Os prontuários de 85 pacientes foram revistos levantando informações relevantes do quadro clínico, procedimento cirúrgico realizado e tipo de lesão histopatológica, assim como seus fatores prognósticos, conforme o protocolo desenvolvido para este fim (Anexo 1).

Entre os 85 pacientes estudados, havia 78 do gênero feminino (91,8%, Gráfico 1). A idade dos pacientes variou entre 65 e 89 anos, com mediana de 70

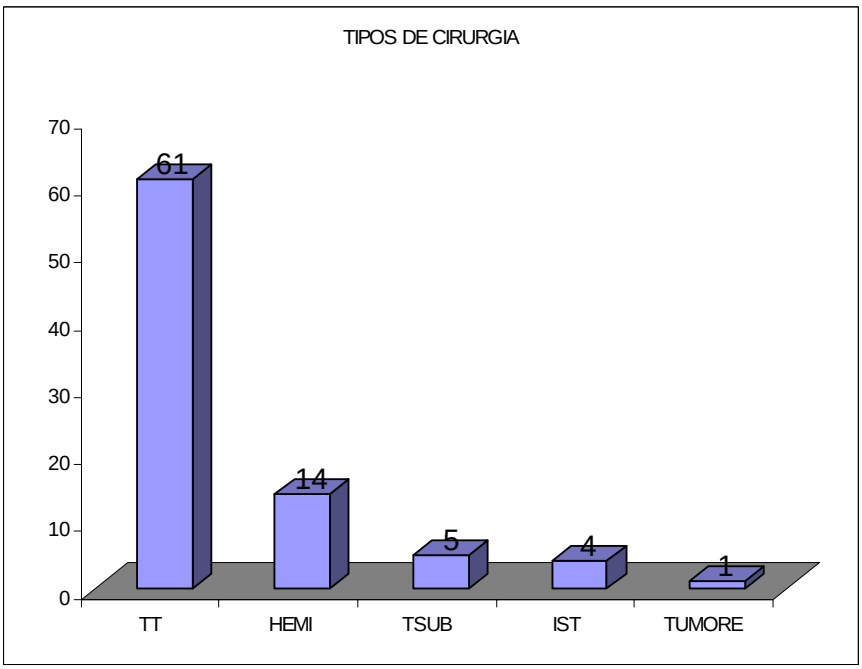
anos. A tireoidectomia total foi realizada em 74% dos pacientes, sendo que a totalização de tireoidectomia foi considerada como tireoidectomia total (Gráfico 2).

Gráfico 1: Distribuição dos pacientes idosos submetidos à tireoidectomia por lesões primárias da tireóide, segundo o gênero



Fonte: SAME-Santa Casa de SP

Gráfico 2: Distribuição dos 104 pacientes idosos submetidos a tireoidectomia,segundo o tipo de cirurgia realizada

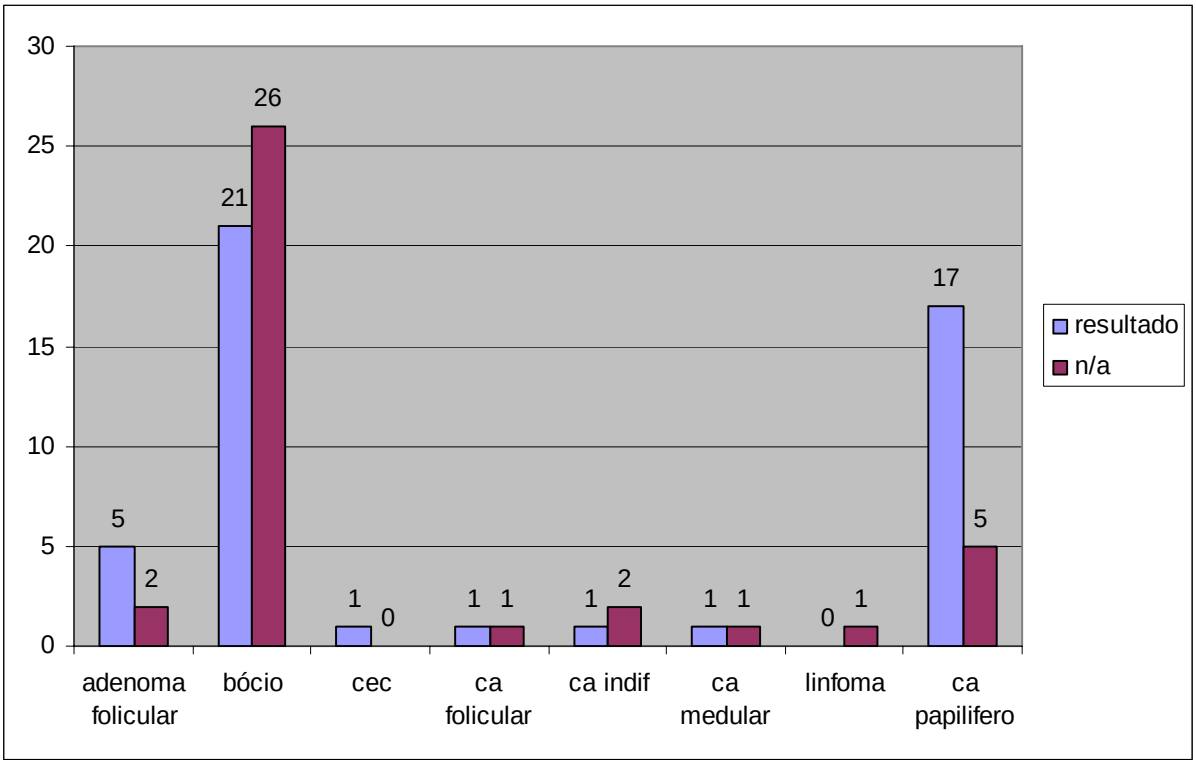


TT: tireoidectomia total; HEMI: hemitireoidectomia; TSUB: tireoidectomia subtotal; IST: istmectomia; TUMORE: tumorectomia
Fonte: SAME-Santa Casa de SP

Nestes mesmos 85 pacientes, a reação de PCR-RT realizada após a extração do DNA dos blocos de parafina, conseguiu detectar a ausência ou presença da mutação BRAF V600E em 47 pacientes (55,3%). A mutação BRAF foi considerada não analisável em 38 pacientes (44,7%).

Nos 47 casos em que a mutação foi analisável, de acordo com o tipo histológico da lesão, encontramos a distribuição demonstrada no Gráfico 3. É importante salientar que para obter um resultado satisfatório, repetimos a metodologia preferencialmente nos casos de carcinoma papilífero e indiferenciado, resultando em mais resultados analisáveis dentre estes dois grupos, particularmente dentre os casos de carcinoma papilífero. De 22 casos, 17 foram analisáveis, ou seja, 77%.

Gráfico 3: Distribuição dos casos segundo o tipo histológico e resultado da PCR-RT



*a coluna resultado representa os casos em que a reação foi analisável
** n/a: não analisável
Cec: carcinoma epidermóide, ca folicular: carcinoma folicular, ca indif: carcinoma indiferenciado ou anaplásico, ca medular: carcinoma medular, ca papilífero: carcinoma papilífero

MÉTODO

Foram realizados cortes de tecido a partir dos blocos de parafina dos produtos de tireoidectomia, após a revisão da lâmina com patologista experiente em doenças da glândula tireóide, e confirmação do diagnóstico, assim como de que o bloco em questão possuía a lesão a ser estudada. Cuidados para evitar contaminação de DNA foram tomados como uso de luvas e navalhas descartáveis e manipulação dos cortes de tecido com pinça apropriada para este fim.

Foi então realizada a extração de DNA, após a desparafinização dos cortes de tecido conforme o protocolo descrito no anexo 2. O sucesso da extração foi confirmado através de espectrofotometria.

Sucedeu-se então a realização da PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) em tempo-real para identificação da mutação do gene BRAF no DNA extraído, utilizando controles positivo (amostra seqüenciada, demonstrando a presença da mutação no gene) e negativo (sangue humano de indivíduo saudável), bem como de reação sem a presença de DNA para garantir a ausência de amplificação inespecífica, em cada placa de reação.

Nesta abordagem diagnóstica, cada amostra biológica é submetida a duas reações de PCR (figura 8), utilizando-se um primer comum (neste caso, o anti-sense) e um primer específico para a seqüência de interesse na sua extremidade 3` (ou seja, em um dos tubos de PCR colocamos um primer sense normal e no outro

tubo de PCR colocamos um primer sense que se pareia com a mutação no último nucleotídeo de sua extremidade 3').

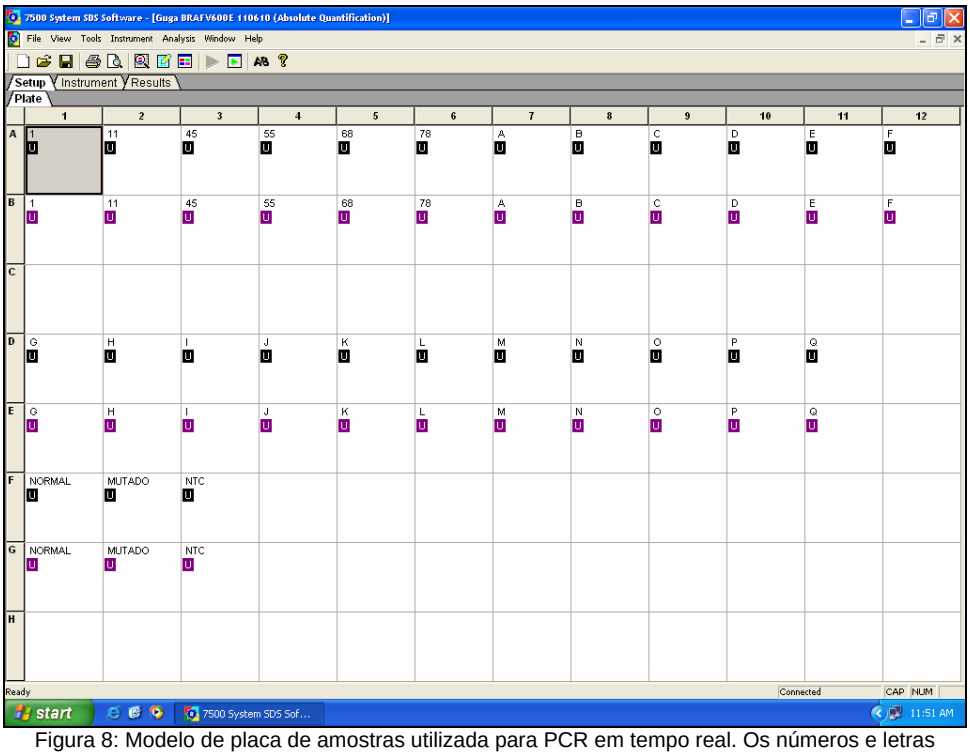


Figura 8: Modelo de placa de amostras utilizada para PCR em tempo real. Os números e letras dentro de cada quadrado corresponde a identificação das amostras. Cada amostra possui duas reações identificadas por cores diferentes – uma contém o primer normal e outra o primer mutado. As últimas 3 amostras são os controle negativo (normal), positivo (mutado) e NTC (*no template Control* – sem reagentes, para termos certeza de que não houve contaminação).

A utilização de equipamento de PCR em tempo-real (Applied Biosystems, ABI 7500) permite a detecção simultaneamente com a amplificação, em tubo fechado, eliminando a etapa pós-PCR e os riscos de contaminação decorrentes da manipulação de produtos amplificados. Adicionalmente, uma vez que a detecção baseia-se na capacidade de um agente intercalador (SYBR Green) emitir fluorescência na presença de dupla-fita amplificada, consegue-se maior sensibilidade analítica, especialmente quando se trata de produtos de PCR de tamanho inferior a 150bp.

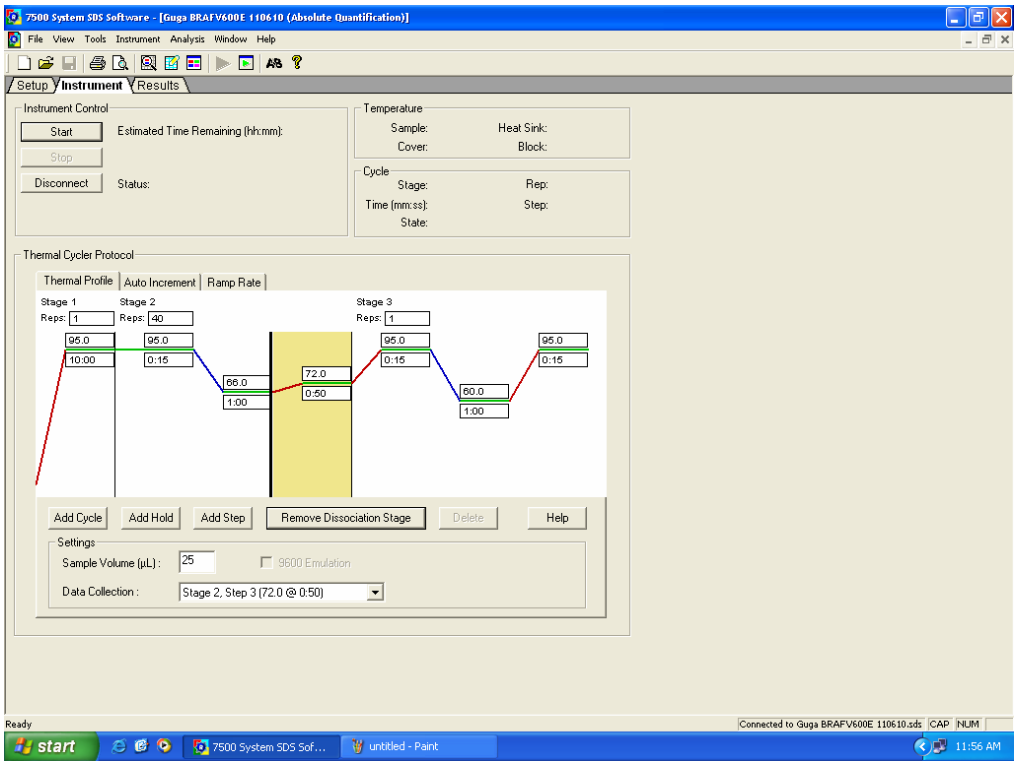


Figura 9: Protocolo de ciclos de temperatura da PCR-RT. Após a ativação inicial da Taq polimerase (stage 1), o ciclo de desnaturação, anelamento e extensão é repetido por 40 vezes, com a detecção da amplificação na fase de extensão do produto (stage 2, step 3). Posteriormente (stage 3), é realizada a desnaturação e esfriamento lentos, para a realização da curva de dissociação.

No preparo das reações de PCR-RT, utilizou-se uma “solução-mãe” para cada condição estudada (normal ou mutado), conforme o quadro 1. As temperaturas utilizadas para a PCR foram: 95^{o}C por 10minutos (ativação da Taq polimerase), seguida de 40 ciclos a 66^{o}C por um minuto (anelamento dos primers) e 72^{o}C por um minuto, conforme demonstra a Figura 9. Para garantir a especificidade da reação e a detecção de um único produto específico na PCR em tempo-real (PCR-RT), adicionamos um ciclo de dissociação (desnaturação lenta) para determinação da temperatura de dissociação de cada produto da PCR (figuras 9, 10 e 11).

Quadro 1 – componentes da “solução-mãe”, utilizada na reação de PCR.

BRAF V600E		
Reagentes	**Wild-type**	**Mutado**
	uL/rx	**uL/rx**
2x Buffer (Fermentas)	12,5	12,5
Primer sense (WtxMt)	0,3 (Wt)	0,3 (Mt)
Primer antisense comum	0,3	0,3
H2O	10,9	10,9
Volume	**24**	**24**
DNA	1	1
Volume total	**25**	**25**

Os primers utilizados foram[72]:

- BRAFwt_s: AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT
- BRAFmt_s: AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA
- BRAF_ASc: TAGTAACTCAGCAGCATCTCAGGGC

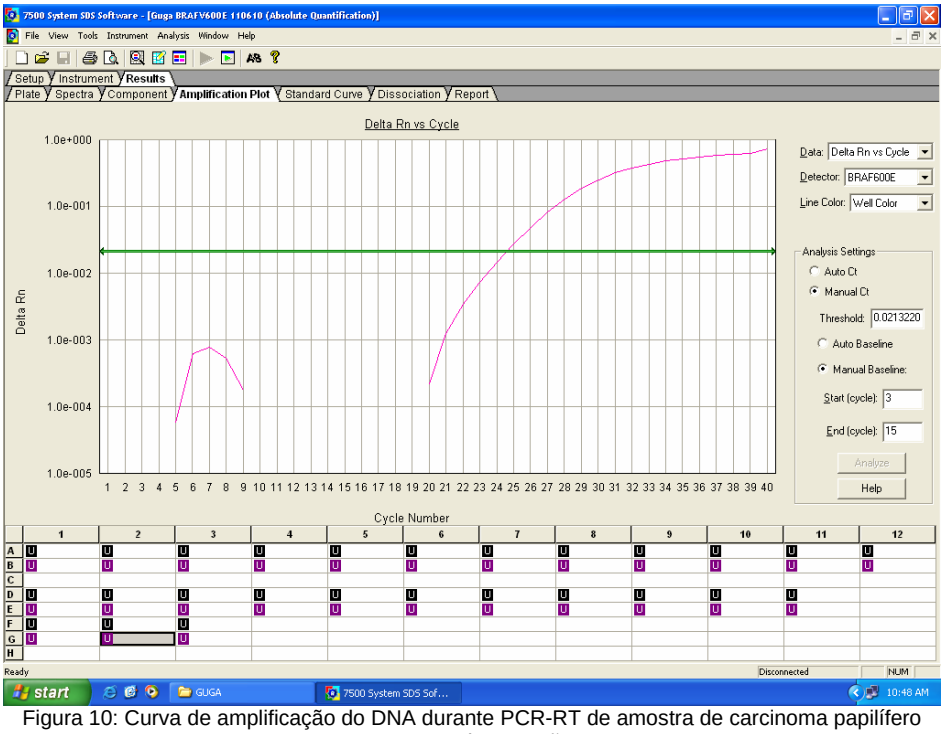


Figura 10: Curva de amplificação do DNA durante PCR-RT de amostra de carcinoma papilífero com a presença da mutação BRAF.

Toda reação foi avaliada inicialmente quanto à curva de amplificação (figura 10) e, nos casos onde esta ocorreu, foi ainda verificada a curva de dissociação (figura 11) para garantir que a temperatura de dissociação (Tm) foi semelhante entre os casos, com pico único de amplificação.

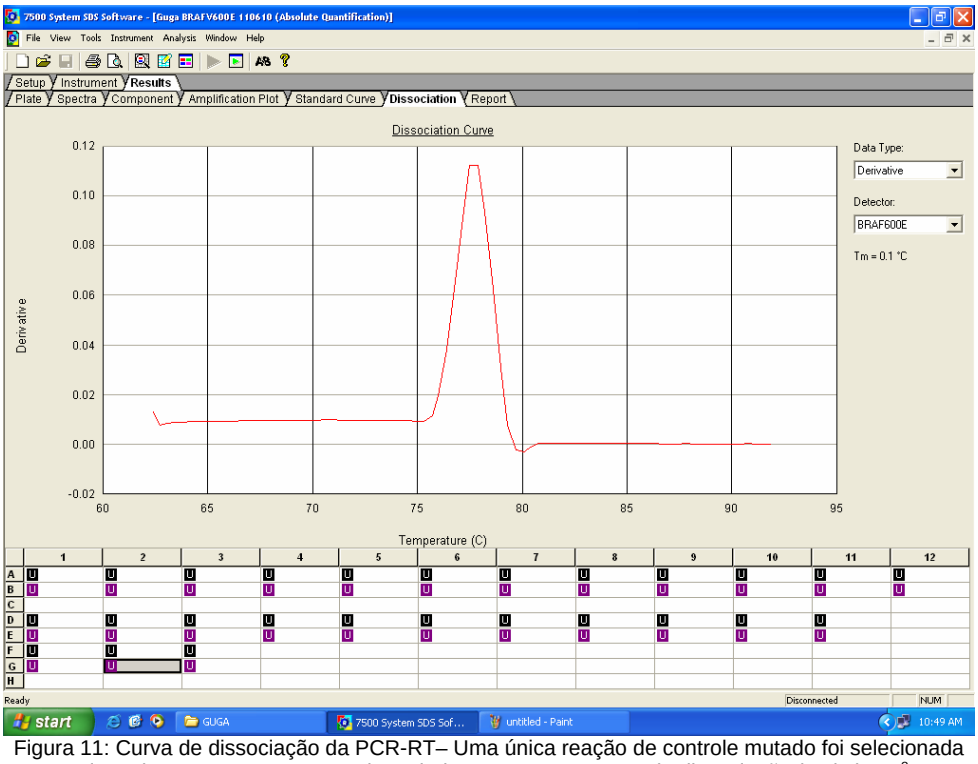


Figura 11: Curva de dissociação da PCR-RT– Uma única reação de controle mutado foi selecionada na placa de amostras representada embaixo, com temperatura de dissociação (Tm) de 77°C, com um único pico de amplificação, garantindo assim que não ocorreu amplificação inespecífica.

Nos casos cujo resultado da PCR-RT não foi analisável, optamos por repetir todo o método para a mesma amostra, buscando resultados positivos. Nos casos de carcinoma papilífero e anaplásico, repetimos a extração de DNA e a PCR-RT até três vezes.

Por fim, a presença ou ausência da mutação BRAF em carcinomas papilíferos com resultado analisável foi correlacionada com as diferentes variantes histológicas (variante clássica, variante folicular e variante de células altas) presentes neste estudo, assim como aos diferentes fatores prognósticos do carcinoma papilífero

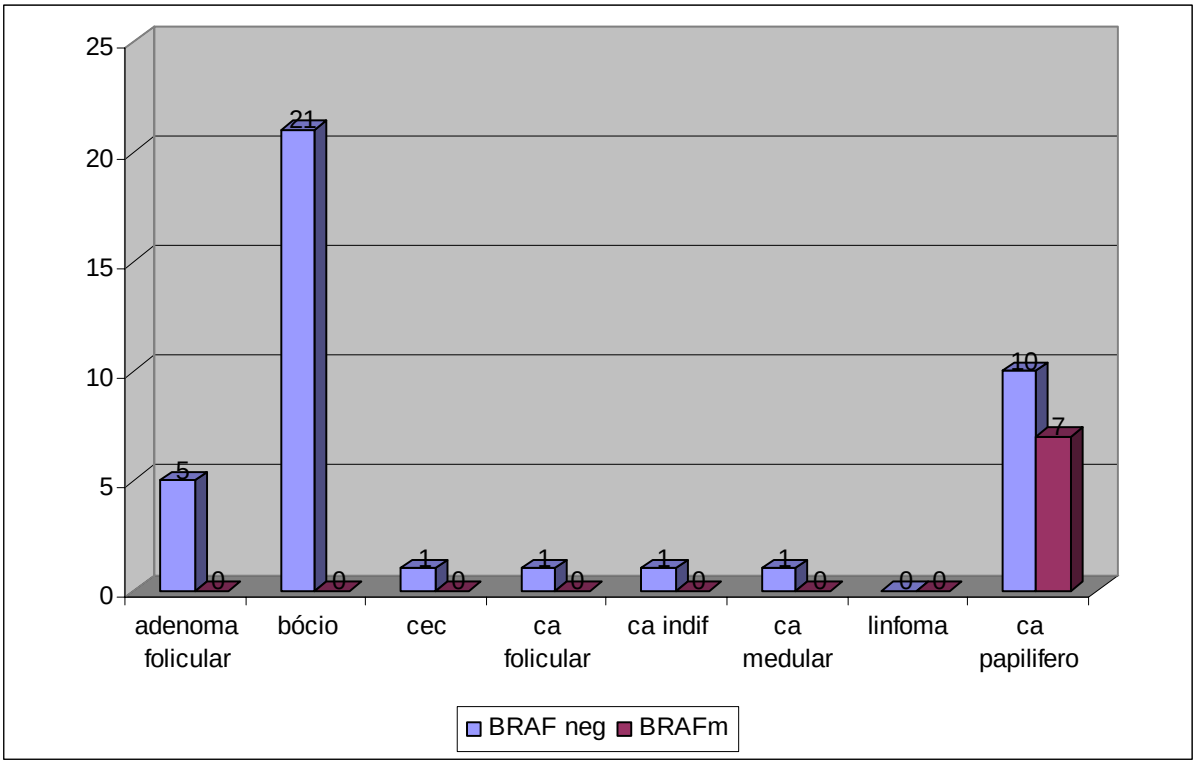
(idade, presença de metástase linfonodal, presença de metástase distantes, presença de tumor multifocal, presença de extravasamento de cápsula tireoideana com invasão de estruturas adjacentes, presença de invasão vascular sanguínea ou linfática e ocorrência de recidiva local ou regional.

A análise estatística incluiu medidas de tendência central e dispersão para as variáveis quantitativas e freqüências absolutas e relativas para as variáveis categóricas. Para verificar a associação entre as variáveis categóricas, foi utilizado o teste exato de Fisher. A avaliação da diferença entre as médias das variáveis quantitativas (idade e tamanho do tumor) segundo o status da mutação, foi empregado o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos quando $p<0,05$ (testes bicaudais). Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Stata for Mac versão 10.0.

RESULTADOS

Nos 47 casos com resultado analisável, dentre as diversas lesões histológicas benignas e malignas estudadas, não encontramos um caso sequer da mutação BRAF em lesões diferentes do carcinoma papilífero, conforme demonstra o Gráfico 4.

Gráfico 4: Distribuição dos casos com resultado analisável, segundo o tipo histológico e resultado da PCR-RT quanto à presença ou ausência da mutação BRAF

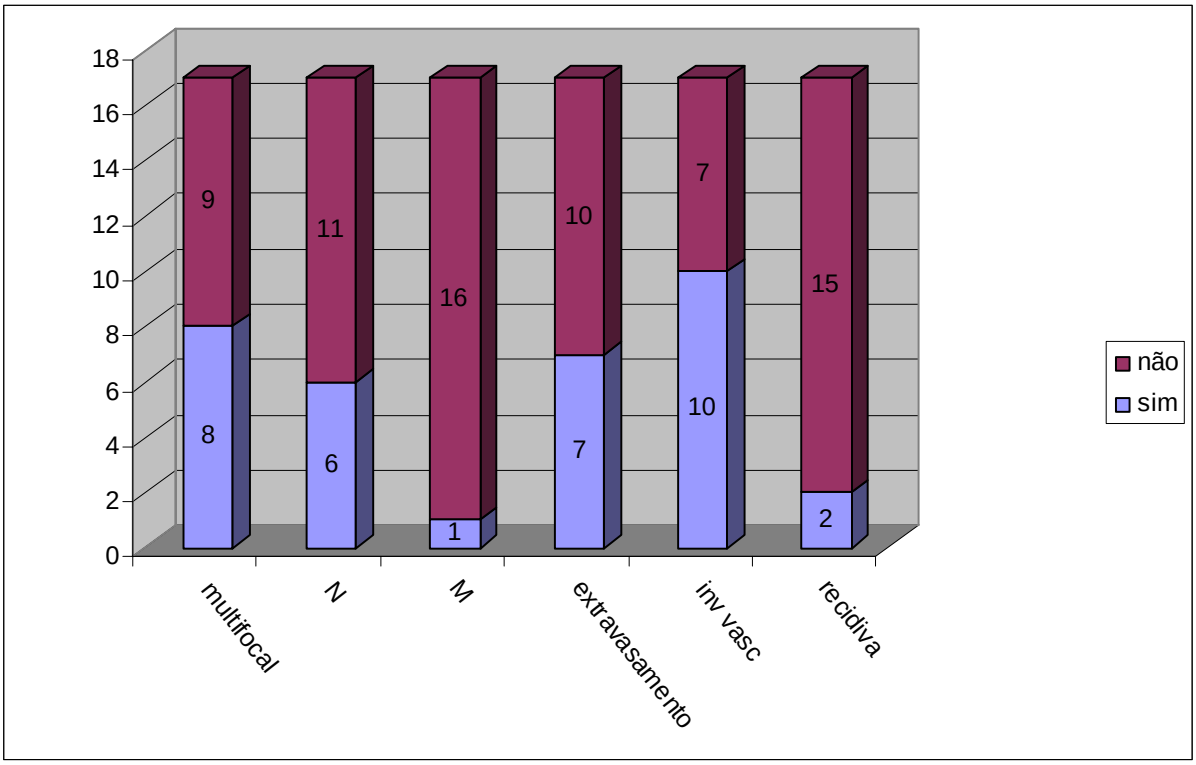


*BRAF-: ausência da mutação BRAF; BRAFm: presença da mutação BRAF
Cec: carcinoma epidermóide, ca folicular: carcinoma folicular, ca indif: carcinoma indiferenciado ou anaplásico, ca medular: carcinoma medular, ca papilífero: carcinoma papilífero

A freqüência da mutação BRAF encontrada considerando-se apenas os carcinomas papilíferos foi de 41,2% (7 casos BRAFm entre 17 com resultado analisável). Entre estes 17 pacientes, a mediana da idade foi de 71 anos (média: 72,5; desvio padrão: 6,18) e havia apenas um paciente do sexo masculino. Quanto as variantes histológicas do carcinoma papilífero, 12 (70,6%) eram da variante clássica, 4 da variante folicular (23,5%) e 1 caso de variante de células altas (5,9%).

A mediana calculada sobre o tamanho do tumor foi de 3,0cm, com média de 3,1cm e desvio padrão de 2,32. Quanto aos demais fatores prognósticos, encontramos multicentricidade em 8 casos, metástases linfonodais em 6 casos, metástases distantes em 1 caso, extravasamento de cápsula em 7 casos, invasão vascular em 10 casos e recidiva local ou regional em 2 casos, conforme demonstra o gráfico 5.

Gráfico 5: Distribuição dos fatores prognósticos do carcinoma papilífero, nos casos com mutação analisável



** N: presença de metástase linfonodal; M: presença de metástase distante; extravasamento: presença de extravasamento da cápsula tireoideana; inv vasc: presença de invasão vascular sanguínea ou linfática; recidiva: recidiva local ou regional
Fonte: Departamento de Ciências Patológicas, Santa Casa de SP

A correlação entre a mutação BRAF e o gênero, não foi significante, pelo teste exato de Fisher (p=0,412), assim como a correlação entre a mutação BRAF e a presença de invasão vascular (p=1,0), recidiva (p=0,154), multicentricidade (p=1,0), e extravasamento da cápsula tireoideana (p=0,058). Neste último fator prognóstico, nós observamos significância estatística próxima ao limite de 5%, sendo observada

diferença na porcentagem de extravasamento, segundo o status da mutação BRAF (71,4 % nos casos BRAFm e 28,6% nos casos BRAF-) (Tabela1).

Analisando o grupo de carcinomas papilíferos, observamos associação com significância entre a variante clássica e o status da mutação BRAF (p=0,044), em comparação com as demais variantes histológicas agrupadas (Tabela1).

Tabela 1: Distribuição dos fatores prognósticos avaliados de acordo com a presença ou ausência da mutação BRAF

fatores prognósticos		**BRAFm**	**%**	**BRAF-**	**%**	**p**
		n=7		n=10		
Gênero	masc	1	14,3	0	0,0	0,412
	fem	6	85,7	10	100,0	
Invasão vascular		4	57,1	3	30,0	1,0
Recidiva		2	28,6	5	50,0	0,154
multicentricidade		3	42,9	5	50,0	1,0
extravasamento		5	71,4	2	20,0	0,058
Variante clássica		7	100,0	5	50,0	0,044

BRAF-: ausência da mutação BRAF; BRAFm: presença da mutação BRAF

As variantes tamanho do tumor e idade foram analisadas pelo teste de Maan-Whitney, não sendo encontrada associação com significância estatística, conforme demonstram os Gráficos 6 e 7, com níveis de significância estatística de 0,8066 e 0,1052 respectivamente.

Gráfico 6: Distribuição dos casos de carcinoma papilífero com resultado analisável, segundo a presença e ausência da mutação BRAF e a idade.

*não: ausência da mutação BRAF; sim: presença da mutação BRAF

Gráfico 7: Distribuição dos casos de carcinoma papilífero com resultado analisável, segundo a presença e ausência da mutação BRAF e o tamanho do tumor

*não: ausência da mutação BRAF; sim: presença da mutação BRAF

Entretanto, a média, e a mediana da idade do grupo de pacientes com a mutação BRAF foi de 75,3 e 74 anos, respectivamente. Já no grupo de pacientes com carcinoma papilífero e ausência da mutação estudada, a média foi de 70,6 e a mediana de 70 anos.

Em suma, estudando apenas indivíduos idosos, encontramos a presença da mutação BRAF V600E apenas em casos de carcinomas papilíferos. Entre 17 pacientes com esta lesão histológica, 7 apresentaram a mutação (41,2%). Entre 47 pacientes em que obtivemos resultado analisável, incluindo os 17 carcinomas papilíferos, 4 outros tipos de tumores malignos e 26 lesões histológicas benignas, nenhum outro tipo de lesão histológica apresentou a mutação. Analisando os fatores prognósticos do carcinoma papilífero, encontramos tendência estatística de associação entre o extravasamento e a presença da mutação BRAF, além de demonstrar associação com significância estatística entre a variante clássica do carcinoma papilífero e a presença da mutação BRAF.

DISCUSSÃO

A mutação pontual do BRAF tem sido bastante estudada mundialmente, com papel fundamental na gênese tumoral do câncer coloretal, melanoma e carcinoma papilífero de tireóide[43]. Embora muitos autores tenham demonstrado técnicas de extração de DNA a partir de tecido parafinizado, em nossa instituição outras tentativas já haviam sido feitas com este fim, sem sucesso. Tal dificuldade era atribuída a formolização da peça e provável dano ao DNA. Finalmente, utilizando um protocolo simples de desparafinização e extração de DNA, conseguimos estabelecer uma rotina para o desenvolvimento deste estudo. Desta forma, abrimos um grande campo de pesquisa em nossa instituição, minimizando a nossa dependência de tecido fresco e bancos de tumores, abrindo a perspectiva da utilização de um grande número de amostras disponíveis no Departamento de Anatomia Patológica.

Tivemos dificuldades na extração de DNA de algumas amostras, sem qualquer correlação com a idade da amostra ou de seu lote, o que nos faz crer que a insistência no método deve trazer melhores resultados. Alguns casos apresentaram um resultado de PCR não analisável, sendo impossível dizer se a mutação em questão estava ou não presente, reduzindo nossa casuística e causando maior gasto de material, uma vez que todo o processo metodológico foi repetido numa tentativa de uma nova extração com sucesso.

Inicialmente este estudo foi desenvolvido para verificar a presença da mutação do BRAF em indivíduos idosos submetidos à tireoidectomia por lesões benignas e malignas. Nossos resultados iniciais demonstram a ausência desta mutação em lesões benignas e em lesões malignas diferentes do carcinoma papilífero, mesmo em indivíduos idosos, o que é corroborado pela literatura[9, 37, 38, 47-

[49, 54]. Xu e cols, em 2003, também descreveram a presença da mutação BRAF em carcinomas papilíferos, e sua ausência em bócios e lesões foliculares[73].

Optamos pela insistência da pesquisa da mutação apenas nos casos de interesse, ou seja, carcinomas papilíferos e carcinomas anaplásicos que poderiam ter sua origem em carcinomas papilíferos[55]. Isso explica o maior número de casos em que tivemos resultado dentre os carcinomas papilíferos, quando comparados ao grupo de bócios (ver Gráfico 3, pág. 19).

A mutação BRAF está ausente em lesões benignas como o bócio colóide e a tireoidite de Hashimoto, assim como em lesões malignas diferentes do carcinoma papilífero, tal como o carcinoma folicular[73], conforme demonstramos também entre os pacientes idosos. Aqueles carcinomas anaplásicos oriundos de carcinomas papilíferos podem conter a mutação[57], embora no presente estudo, analisamos apenas um caso de carcinoma anaplásico que não a apresentava.

Oler e Cerutti, em nosso meio, estudaram 120 casos de carcinoma papilífero, dos quais 48% apresentaram a mutação BRAF[74]. Fugazzola e cols, na introdução de seu estudo (2006), cita que a prevalência mundial da mutação BRAF em carcinomas papilíferos gira em torno dos 40% (858 de 2174 casos estudados, ver figura 7, pág. 10)[49]. Os mesmos autores, num estudo multicêntrico italiano, estudaram 260 carcinomas papilíferos e encontraram a mutação BRAF em 38% deles[49]. Também em nosso meio, Araújo e cols, em 2009 demonstraram uma incidência de 28,1% (9 de 32), em carcinomas papilíferos[75]. Nosso estudo

demonstra uma freqüência um pouco acima do relatado (41,2%), o que é facilmente justificável, tendo em vista a população estudada.

A mutação BRAF também está associada a carcinomas papilíferos localmente invasivos, assim como aos carcinomas papilíferos que apresentam extravasamento de cápsula[70, 76], ou mesmo a lesões não encapsuladas. Em nossa casuística, encontramos tendência de associação com significância entre o extravasamento e a mutação BRAF (p=0,058), o que pode conferir à mutação BRAF, neste aspecto, um significado prognóstico.

Lupi e cols[1], da Universidade de Pisa (Itália), em 2007, estudaram 500 pacientes com carcinomas papilíferos de tireóide (230 microcarcinomas, 82 variantes clássicas, 114 variantes foliculares, 40 variantes de células altas e 34 de demais variantes). A freqüência da mutação BRAF foi de 43,8%, sendo mais alta na variante de células altas (80%) e na variante clássica (68,3%), e mais baixa na variante folicular (18,8%). Entre o grupo de microcarcinomas, a freqüência foi de 39,4%. Em nosso estudo, também demonstramos uma alta freqüência da mutação BRAF nos carcinomas papilíferos da variante clássica (58,3%), com associação estatística entre elas.

Na mesma série de Lupi e cols, não houve relação com significância estatística entre a idade, o sexo e a presença da mutação à análise univariada, mas houve associação estatística da mutação com invasão extra-tireoideana, multicentricidade, metástases linfáticas, estádio III versus estádio I e II, e ausência de cápsula tumoral. Já à análise multivariada, apenas a presença de cápsula tumoral

estava associada à ausência da mutação BRAF, que neste aspecto sugere um melhor prognóstico. Apesar da pequena casuística de nosso estudo, conseguimos demonstrar uma tendência de associação entre o extravasamento tireoideano e a presença da mutação BRAF o que pode traduzir um pior prognóstico.

Embora a mutação BRAF seja a anormalidade genética mais comum no carcinoma papilífero de tireóide, o seu significado prognóstico a longo prazo ainda não está bem estabelecido. Estudos contraditórios tem sido publicados, provavelmente pela heterogeneidade do carcinoma papilífero ao redor do mundo e diferentes fenótipos que se sobrepõem devido à alterações genéticas diferentes[8, 70, 77, 78].

A associação entre a variante clássica do carcinoma papilífero e a mutação BRAF já havia sido demonstrada[54, 64, 79, 80]. Em nosso estudo, encontramos associação com significância entre a presença da mutação BRAF e a variante clássica do carcinoma papilífero. Mas devido ao pequeno número de casos analisados, não encontramos associação estatística entre os demais fatores prognósticos e o status da mutação BRAF. Oler e Cerutti, em 2009, demonstraram a associação entre a variante clássica do carcinoma papilífero e a mutação BRAF, com um fenótipo mais agressivo devido a menor expressão de genes metabolizadores de iodo, sugerindo a detecção da mutação BRAF como fator prognóstico, e auxiliar na escolha terapêutica em pacientes com carcinoma papilífero[74].

Acredita-se que os carcinomas papilíferos com a mutação BRAF podem apresentar menor captação de iodo no pós-operatório, o que traduz um fenótipo mais agressivo e maior chance de recorrência[67, 81, 82], apontando que nesses casos, ao menos o seguimento clínico deve ser absolutamente rigoroso.

Recentemente, Elisei e cols, publicaram a primeira série de casos com seguimento consistente para sugerir que a mutação BRAF está associada a um pior prognóstico e parece ser um fator independente da idade[76]. Em 102 pacientes com carcinoma papilífero e com seguimento médio de 15 anos, a freqüência da mutação foi de 37,3%, mas se apresentou maior nos pacientes com mais de 60 anos, o que corrobora os dados encontrados em nosso estudo. Demonstraram ainda, associação da mutação com estadios mais avançados, invasão vascular, e um prognóstico pior[76]. Apesar de termos estudado apenas indivíduos com mais de 65 anos, sabemos que quanto maior a idade, pior o prognóstico do carcinoma papilífero, o que nos motivou a estudar a associação da idade com a mutação BRAF, demonstrando, sem significância estatística, que os pacientes BRAFm possuíam idade mais avançada.

Assim, podemos dizer que mesmo em indivíduos idosos, a mutação BRAF foi encontrada apenas em carcinomas papilíferos, com uma freqüência de 41,2%. Demonstramos ainda a associação entre a variante clássica do carcinoma papilífero e a presença da mutação BRAF, mesmo em uma pequena casuística de pacientes idosos. Encontramos ainda, tendência estatística de associação entre o extravasamento tireoideano e a presença da mutação BRAF, além de uma maior mediana de idade neste grupo, sem significância estatística.

Entretanto, nossos resultados não nos permitem concluir que a presença da mutação BRAF está associada com um pior prognóstico, no carcinoma papilífero de tireóide, tendo em vista a pequena casuística estudada, e mesmo porque não nos interessou neste estudo, o tempo de seguimento e a sobrevida destes pacientes. Talvez, estes sejam objetivos para a continuidade deste estudo com aumento da casuística, envolvimento de outras instituições e seguimento clínico prolongado, tentando definir assim o real valor prognóstico da mutação BRAF no carcinoma papilífero de tireóide, em nosso meio.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições de execução do presente estudo permitem concluir que a mutação BRAF, nos pacientes idosos, também é exclusiva do carcinoma papilífero e tem freqüência expressiva. Além disso, está relacionada com sua variante clássica e pode estar relacionada ao extravasamento tireoideano.

ANEXOS

Anexo 1

PROTOCOLO CIRURGIA DE TIREÓIDE NA POPULAÇÃO GERIÁTRICA NÚMERO:_____

IDENTIFICAÇÃO **RG:**_____

NOME:_____

IDADE (na data da cirurgia):_____ RAÇA: □Branca □Parda □Negra

TEL: _____

END: _____

CIDADE: _____ ESTADO: _____ CEP:_____

DADOS CLÍNICOS

QUEIXA: _____ TEMPO:_____

□ BÓCIO UNINODULAR □ BÓCIO MULTINODULAR □ BÓCIO DIFUSO

□ TÓXICO □ ATÓXICO □ HISTORIA FAMILIAR

MERGULHANTE: □ SIM □ NÃO □ RADIOTERAPIA PRÉVIA

INDICAÇÃO: □MALIGNIDADE □>3CM □MERGULHANTE □ESTÉTICA

□SINTOMAS COMPRESSIVOS □OUTRA: _____

COMORBIDADES

□HAS □DM □ICC □ICO □OUTRAS: 1- _____
2- _____

AVALIAÇÃO ESPECIALIZADA: □ANESTESISTA □CLÍNICO □CARDIOLOGISTA

□OUTROS:_____

LIBERADO PARA CIRURGIA: □SIM □NÃO - PORQUE:_____

RECOMENDAÇÕES:_____

ASA : □ I □ II □ III □ IV □ V Obs: _____

EXAMES PRÉ-OPERATÓRIOS

TSH:_____ T4L:_____ ANTICORPOS: □NORMAL □ELEVADO

USG: □BUN □BM □MICROCALCIF □HIPERVASCULARIZAÇÃO □VEGETAÇÃO

TAMANHO DO MAIOR NÓDULO:_____ Obs:_____

PAAF: □colóide □folicular □papilífero □inconclusivo □outro:_____

□RX TÓRAX □ECG □SANGUE □OUTROS: 1-_____
2-_____
3-_____

Obs:_____

Estadiamento: cT_____cN_____cM_____

_____1_____

PROTOCOLO CIRURGIA DE TIREÓIDE NA POPULAÇÃO GERIÁTRICA NÚMERO:_____

CIRURGIA – data: ____/_____/_____

□TT □HEMI □TS □ISTMECTOMIA □NODULECTOMIA □TQT

□TUMORECTOMIA □ OUTRA:_____

INVASÃO DE ESTRUTURAS: □NÃO □SIM-QUAL:_____

ESVAZIAMENTO CERVICAL: □NÃO □SIM-NÍVEL:_____

CONGELAÇÃO: □BENIGNO □MALIGNO OBS:_____

□LESÃO RECORRENTE – MOTIVO:_____

□REIMPLANTE DE PT – LOCAL: _____

TEMPO CIRÚRGICO:_____ Obs:_____

ANATOMOPATOLÓGICO – número:_____

□Benigno

□Bócio adenomatoso
□nódulo colóide
□adenoma folicular
□tireoidite
□Outro:_____

□MALIGNO

□CA PAPILÍFERO
□CA FOLICULAR
□CA MEDULAR
□CA INDIFERENCIADO
□Outro:_____

pT___ pN___pM____

VARIANTE:_____
TAMANHO:_____
□INVASÃO VASC SANG
□INVASÃO VASC LINFÁTICA
□INVASÃO PERINEURAL
□EXTRAVAZ TIREOIDEANO

INVASÃO DE ESTRUTURAS: □NÃO □SIM-QUAL:_____

LINFONODOS POSITIVOS: □NÃO □SIM-NÚMERO/NÍVEL:_____

OBS:_____

EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

TEMPODE INTERNAÇÃO:_____ DIAS Obs:_____

COMPLICAÇÃO □não □sim-qual:_____

TRATAMENTO:_____

USO DE HORMÔNIO: □não □sim-qual/dose:_____

USO DE CÁLCIO: □não □sim-dose/tempo:_____

HIPOPARATIREOIDISMO: □NÃO □SIM-□TEMPORÁRIO □DEFINITIVO

LARINGOSCOPIA: □NÃO □SIM: □PARESIA □PARALISIA Obs:_____

SEGUIMENTO

TEMPO: _____ REOP: _____
PCI:_____
RADIOIODO(DATA/DOSE):_____
TSH(DATA/VALOR):_____
TG(DATA/VALOR):_____
RECIDIVA: □NÃO □SIM □LOCAL □REGIONAL OBSERVAÇÃO:_____
RADIOTERAPIA: □NÃO □SIM DOSE:_____MOTIVO:_____
METÁSTASE A DISTÂNCIA: □NÃO □SIM- □PULMÃO □OUTRO:_____

Anexo 2

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINIZADO

Reagentes:
Xylol
Etanol 100%
Solução de proteinase K (10mg/mL)
Água ultrapura

Solução tampão:
10X PCR buffer
300µg/mL proteinase K

Para 1mL:
870µL água ultrapura
100µL 10 10X PCR buffer
30µL proteinase K (10mg/mL)

1. Use luvas, limpe meticulosamente a lâmina com xylol antes de cortar e entre os cortes. A espessura e o número de cortes requeridos depende da intenção da extração e do tamanho do bloco. Por exemplo, para pequenos números de amplificação normal de PCR, uma única amostra de 5-10µm de espessura, de um bloco de 0,5x0,5mm será suficiente. Para biópsias gastro-intestinais ou materiais similares, ao menos 6 a 10 cortes de 10µm são necessárias.
2. Corte as amostras e coloque em um tubo rotulado de 1,5mL com o auxílio de uma pipeta.
3. Centrifugue o tubo para certificar de que seu conteúdo está no fundo e não será ejetado quando a tampa é aberta.
4. Adicione 1mL de xylol, misture bem por 10 segundos em vortex e deixe 3 a 5 minutos à temperatura ambiente. Centrifugue em máxima velocidade por 4 minutos. Remova o xylol com uma pipeta e despreze.
5. Repita o passo 4.
6. Adicione 1mL de etanol 100%, misture bem por 10 segundos em vortex e centrifugue em máxima velocidade por 2 minutos. Remova o etanol com uma pipeta e despreze.
7. Repita o passo 6.
8. Seque a amostra em temperatura ambiente ou em banho seco (até 65ºC) por aproximadamente 10 a 30 minutos, dependendo da quantidade de tecido. O tecido adquire um aspecto algodonoso quando seco.
9. Adicione 50-200µL da solução tampão e mexa o frasco gentilmente, assegurando que o tecido está imerso na solução. O volume da solução tampão requerido depende da quantidade de tecido da amostra; como guia, utilize 100µL da solução para um corte único de de um bloco de 0,5x0,5mm.
10. Coloque o tubo em banho seco a 37ºC até o dia seguinte, ou a 55ºC por 3 horas, com movimentação intermitente.
11. Centrifugue o tubo brevemente, aqueça a 95ºC por 15 minutos, cemtrifugue novamente.
12. Use 1 a 5µL do sobrenadante para a PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lupi, C., R. Giannini, C. Ugolini, A. Proietti, P. Berti, M. Minuto, et al., *Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(11): p. 4085-90.
2. Wojciechowska, K. and A. Lewinski, *BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma.* Endocr Regul, 2006. **40**(4): p. 129-38.
3. Vini, L., S.L. Hyer, J. Marshall, R. A'Hern, and C. Harmer, *Long-term results in elderly patients with differentiated thyroid carcinoma.* Cancer, 2003. **97**(11): p. 2736-42.
4. van Tol, K.M., E.G. de Vries, R.P. Dullaart, and T.P. Links, *Differentiated thyroid carcinoma in the elderly.* Crit Rev Oncol Hematol, 2001. **38**(1): p. 79-91.
5. Uruno, T., A. Miyauchi, K. Shimizu, C. Tomoda, Y. Takamura, Y. Ito, et al., *Favorable surgical results in 433 elderly patients with papillary thyroid cancer.* World J Surg, 2005. **29**(11): p. 1497-501; discussion 1502-3.
6. Passler, C., R. Avanessian, K. Kaczirek, G. Prager, C. Scheuba, and B. Niederle, *Thyroid surgery in the geriatric patient.* Arch Surg, 2002. **137**(11): p. 1243-8.
7. Maciel, R.M., E.T. Kimura, and J.M. Cerutti, *[Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular)].* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2005. **49**(5): p. 691-700.
8. Jarzab, B. and D. Handkiewicz-Junak, *Differentiated thyroid cancer in children and adults: same or distinct disease?* Hormones (Athens), 2007. **6**(3): p. 200-9.
9. Nakamura, N., J.A. Carney, L. Jin, S. Kajita, J. Pallares, H. Zhang, et al., *RASSF1A and NORE1A methylation and BRAFV600E mutations in thyroid tumors.* Lab Invest, 2005. **85**(9): p. 1065-75.
10. Matsuo, S.E., L. Martins, S.G. Leoni, D. Hajjar, J.C. Ricarte-Filho, K.N. Ebina, et al., *[Biological markers in thyroid tumors].* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2004. **48**(1): p. 114-25.
11. Cohen, Y., M. Xing, E. Mambo, Z. Guo, G. Wu, B. Trink, et al., *BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma.* J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(8): p. 625-7.
12. Ciampi, R., J.A. Knauf, H.M. Rabes, J.A. Fagin, and Y.E. Nikiforov, *BRAF kinase activation via chromosomal rearrangement in radiation-induced and sporadic thyroid cancer.* Cell Cycle, 2005. **4**(4): p. 547-8.
13. Liu, D., Z. Liu, D. Jiang, A.P. Dackiw, and M. Xing, *Inhibitory effects of the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 on the proliferation and tumor growth of thyroid cancer cells with BRAF or RAS mutations.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4686-95.
14. Mitsutake, N., M. Miyagishi, S. Mitsutake, N. Akeno, C. Mesa, Jr., J.A. Knauf, et al., *BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis.* Endocrinology, 2006. **147**(2): p. 1014-9.
15. Xing, M., V. Vasko, G. Tallini, A. Larin, G. Wu, R. Udelsman, et al., *BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1365-8.
16. Xing, M., *BRAF mutation in thyroid cancer.* Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(2): p. 245-62.
17. Knauf, J.A., B. Ouyang, E.S. Knudsen, K. Fukasawa, G. Babcock, and J.A. Fagin, *Oncogenic RAS induces accelerated transition through G2/M and promotes defects in the G2 DNA damage and mitotic spindle checkpoints.* J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 3800-9.

18. Mitsiades, C.S., P. Hayden, V. Kotoula, D.W. McMillin, C. McMullan, J. Negri, et al., *Bcl-2 overexpression in thyroid carcinoma cells increases sensitivity to Bcl-2 homology 3 domain inhibition.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4845-52.
19. Bliss, R., N. Patel, A. Guinea, T.S. Reeve, and L. Delbridge, *Age is no contraindication to thyroid surgery.* Age Ageing, 1999. **28**(4): p. 363-6.
20. Falvo, L., A. Catania, S. Sorrenti, V. D'Andrea, A. Berni, M. De Stefano, et al., *Prognostic significance of the age factor in the thyroid cancer: statistical analysis.* J Surg Oncol, 2004. **88**(4): p. 217-22.
21. Kuijpens, J.L., M.L. Janssen-Heijnen, V.E. Lemmens, H.R. Haak, A.C. Heijckmann, and J.W. Coebergh, *Comorbidity in newly diagnosed thyroid cancer patients: a population-based study on prevalence and the impact on treatment and survival.* Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **64**(4): p. 450-5.
22. Lang, B.H. and C.Y. Lo, *Total thyroidectomy for multinodular goiter in the elderly.* Am J Surg, 2005. **190**(3): p. 418-23.
23. Owen, P.J., J.H. Lazarus, and R.E. Morse, *Unusual complications of thyroid carcinoma.* Postgrad Med J, 2003. **79**(927): p. 55-6.
24. Rios, A., J.M. Rodriguez, P.J. Galindo, M. Canteras, and P. Parrilla, *Surgical treatment for multinodular goitres in geriatric patients.* Langenbecks Arch Surg, 2005. **390**(3): p. 236-42.
25. Biliotti, G.C., F. Martini, V. Vezzosi, P. Seghi, F. Tozzi, A. Castagnoli, et al., *Specific features of differentiated thyroid carcinoma in patients over 70 years of age.* J Surg Oncol, 2006. **93**(3): p. 194-8.
26. Coburn, M.C. and H.J. Wanebo, *Age correlates with increased frequency of high risk factors in elderly patients with thyroid cancer.* Am J Surg, 1995. **170**(5): p. 471-5.
27. Hundahl, S.A., I.D. Fleming, A.M. Fremgen, and H.R. Menck, *A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995.* Cancer, 1998. **83**(12): p. 2638-48.
28. Sobrinho, J.A., J.C. Neto, and M.B. Carvalho, *Fatores prognósticos nos tumores malignos da glândula tireóidea*, in *Tratado de Tireóide e Paratireóides*, M.B. Carvalho, Editor. 2007, Ed. Rubio: Rio de Janeiro. p. 463-480.
29. Ramos, L.R., *A explosão demográfica da Terceira idade no Brasil: uma questão de saúde pública.* Gerontologia, 1993. **1**: p. 3-8.
30. Veras, R.P., L.R. Ramos, and A. Kalache, *Crescimento da população idosa no Brasil.* Rev Saúde Públ, 1987. **21**: p. 225-233.
31. Namba, H., K. Matsuo, and J.A. Fagin, *Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors.* J Clin Invest, 1990. **86**(1): p. 120-5.
32. Ward, L.S., *Bases Moleculares das Neoplasias Bem-diferenciadas da Glândula Tireóidea*, in *Tratado de Tireóide e Paratireóides*, M.B. Carvalho, Editor. 2007, Editora Rubio: Rio de Janeiro. p. 433-440.
33. Namba, H., V. Saenko, and S. Yamashita, *Nuclear factor-kB in thyroid carcinogenesis and progression: a novel therapeutic target for advanced thyroid cancer.* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2007. **51**(5): p. 843-51.
34. Onda, M., I. Nakamura, S. Suzuki, S. Takenoshita, C.H. Brogren, S. Stampanoni, et al., *Microsatellite instability in thyroid cancer: hot spots, clinicopathological implications, and prognostic significance.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(11): p. 3444-9.
35. Musholt, T.J., P.B. Musholt, N. Khaladj, D. Schulz, G.F. Scheumann, and J. Klempnauer, *Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma.* Surgery, 2000. **128**(6): p. 984-93.

36. Salvatore, G., V. De Falco, P. Salerno, T.C. Nappi, S. Pepe, G. Troncone, et al., *BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1623-9.
37. Kimura, E.T., M.N. Nikiforova, Z. Zhu, J.A. Knauf, Y.E. Nikiforov, and J.A. Fagin, *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. **63**(7): p. 1454-7.
38. Knauf, J.A., X. Ma, E.P. Smith, L. Zhang, N. Mitsutake, X.H. Liao, et al., *Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation.* Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4238-45.
39. Oler, G., K.N. Ebina, P. Michaluart, Jr., E.T. Kimura, and J. Cerutti, *Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis.* Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **62**(4): p. 509-11.
40. Fugazzola, L., D. Mannavola, V. Cirello, G. Vannucchi, M. Muzza, L. Vicentini, et al., *BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers.* Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(2): p. 239-43.
41. Chiloeches, A. and R. Marais, *Is BRAF the Achilles' Heel of thyroid cancer?* Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1661-4.
42. Kumagai, A., H. Namba, S. Takakura, E. Inamasu, V.A. Saenko, A. Ohtsuru, et al., *No evidence of ARAF, CRAF and MET mutations in BRAFT1799A negative human papillary thyroid carcinoma.* Endocr J, 2006. **53**(5): p. 615-20.
43. Fagin, J.A., *How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy.* J Endocrinol, 2004. **183**(2): p. 249-56.
44. Ouyang, B., J.A. Knauf, E.P. Smith, L. Zhang, T. Ramsey, N. Yusuff, et al., *Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1785-93.
45. Ball, D.W., N. Jin, D.M. Rosen, A. Dackiw, D. Sidransky, M. Xing, et al., *Selective growth inhibition in BRAF mutant thyroid cancer by the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4712-8.
46. Santoro, M. and A. Fusco, *New drugs in thyroid cancer.* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2007. **51**(5): p. 857-61.
47. Fagin, J.A., *Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics--role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(9): p. 4264-6.
48. Cohen, Y., E. Rosenbaum, D.P. Clark, M.A. Zeiger, C.B. Umbricht, R.P. Tufano, et al., *Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2761-5.
49. Fugazzola, L., E. Puxeddu, N. Avenia, C. Romei, V. Cirello, A. Cavaliere, et al., *Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature.* Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(2): p. 455-64.
50. Porra, V., C. Ferraro-Peyret, C. Durand, S. Selmi-Ruby, H. Giroud, N. Berger-Dutrieux, et al., *Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 3028-35.
51. Perren, A., S. Schmid, T. Locher, P. Saremaslani, C. Bonvin, P.U. Heitz, et al., *BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in*

endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors. Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(4): p. 855-60.

52. Ward, L.S., E.C. Morari, J.L. Leite, N.E. Bufalo, A.C. Guilhen, P.P. de Araujo, et al., *Identifying a risk profile for thyroid cancer.* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2007. **51**(5): p. 713-22.
53. Lima, J., V. Trovisco, P. Soares, V. Maximo, J. Magalhaes, G. Salvatore, et al., *BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(9): p. 4267-71.
54. Nikiforova, M.N., E.T. Kimura, M. Gandhi, P.W. Biddinger, J.A. Knauf, F. Basolo, 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. **88**(11): p. 5399-404.
55. Quiros, R.M., H.G. Ding, P. Gattuso, R.A. Prinz, and X. Xu, *Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations.* Cancer, 2005. **103**(11): p. 2261-8.
56. Voutilainen, P.E., M. Multanen, R.K. Haapiainen, A.K. Leppaniemi, and A.H. Sivula, *Anaplastic thyroid carcinoma survival.* World J Surg, 1999. **23**(9): p. 975-8; discussion 978-9.
57. Begum, S., E. Rosenbaum, R. Henrique, Y. Cohen, D. Sidransky, and W.H. Westra, *BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment.* Mod Pathol, 2004. **17**(11): p. 1359-63.
58. Pasieka, J.L., *Anaplastic thyroid cancer.* Curr Opin Oncol, 2003. **15**(1): p. 78-83.
59. Kumagai, A., H. Namba, Z. Akanov, V.A. Saenko, S. Meirmanov, A. Ohtsuru, et al., *Clinical implications of pre-operative rapid BRAF analysis for papillary thyroid cancer.* Endocr J, 2007. **54**(3): p. 399-405.
60. Kumagai, A., H. Namba, V.A. Saenko, K. Ashizawa, A. Ohtsuru, M. Ito, et al., *Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(9): p. 4280-4.
61. Mesa, C., Jr., M. Mirza, N. Mitsutake, M. Sartor, M. Medvedovic, C. Tomlinson, et al., *Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling.* Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6521-9.
62. Monte, O., L.E. Calliari, C. Kochi, N.M. Scalisse, M. Marone, and C.A. Longui, *[Thyroid carcinoma in children and adolescents].* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2007. **51**(5): p. 763-8.
63. Namba, H., M. Nakashima, T. Hayashi, N. Hayashida, S. Maeda, T.I. Rogounovitch, et al., *Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4393-7.
64. Trovisco, V., P. Soares, A. Preto, I.V. de Castro, J. Lima, P. Castro, et al., *Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness.* Virchows Arch, 2005. **446**(6): p. 589-95.
65. Rosenbaum, E., G. Hosler, M. Zahurak, Y. Cohen, D. Sidransky, and W.H. Westra, *Mutational activation of BRAF is not a major event in sporadic childhood papillary thyroid carcinoma.* Mod Pathol, 2005. **18**(7): p. 898-902.
66. Xing, M., W.H. Westra, R.P. Tufano, Y. Cohen, E. Rosenbaum, K.J. Rhoden, et al., *BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(12): p. 6373-9.
67. Riesco-Eizaguirre, G., P. Gutierrez-Martinez, M.A. Garcia-Cabezas, M. Nistal, and P. Santisteban, *The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence*

and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na+/I-targeting to the membrane. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 257-69.

68. Puxeddu, E., S. Moretti, R. Elisei, C. Romei, R. Pascucci, M. Martinelli, et al., *BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2414-20.
69. Ito, Y., H. Yoshida, R. Maruo, S. Morita, T. Takano, M. Hirokawa, et al., *BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients.* Endocr J, 2009. **56**(1): p. 89-97.
70. Jo, Y.S., S. Li, J.H. Song, K.H. Kwon, J.C. Lee, S.Y. Rha, et al., *Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(9): p. 3667-70.
71. Soares, P., V. Trovisco, A.S. Rocha, T. Feijao, A.P. Rebocho, E. Fonseca, et al., *BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas.* Virchows Arch, 2004. **444**(6): p. 572-6.
72. Zaravinos, A., J. Bizakis, and D.A. Spandidos, *RKIP and BRAF aberrations in human nasal polyps and the adjacent turbinate mucosae.* Cancer Lett, 2008. **264**(2): p. 288-98.
73. Xu, X., R.M. Quiros, P. Gattuso, K.B. Ain, and R.A. Prinz, *High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines.* Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4561-7.
74. Oler, G. and J.M. Cerutti, *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. **115**(5): p. 972-80.
75. Araújo, P.P.C., *Análise da expressão do gene BRAF - implicações diagnósticas e prognósticas para portadores de carcinoma papilífero da tiróide. Tese (Mestrado).* 2009, UNICAMP: Campinas.
76. Elisei, R., C. Ugolini, D. Viola, C. Lupi, A. Biagini, R. Giannini, et al., *BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 3943-9.
77. Oler, G., C.P. Camacho, F.C. Hojaij, P. Michaluart, Jr., G.J. Riggins, and J.M. Cerutti, *Gene expression profiling of papillary thyroid carcinoma identifies transcripts correlated with BRAF mutational status and lymph node metastasis.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(15): p. 4735-42.
78. Puxeddu, E. and S. Moretti, *Clinical prognosis in BRAF-mutated PTC.* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2007. **51**(5): p. 736-47.
79. Kebebew, E., J. Weng, J. Bauer, G. Ranvier, O.H. Clark, Q.Y. Duh, et al., *The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer.* Ann Surg, 2007. **246**(3): p. 466-70; discussion 470-1.
80. Trovisco, V., I. Vieira de Castro, P. Soares, V. Maximo, P. Silva, J. Magalhaes, et al., *BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma.* J Pathol, 2004. **202**(2): p. 247-51.
81. Oler, G., C.D. Nakabashi, R.P. Biscolla, and J.M. Cerutti, *Seven-year follow-up of a juvenile female with papillary thyroid carcinoma with poor outcome, BRAF mutation and loss of expression of iodine-metabolizing genes.* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008. **52**(8): p. 1313-6.
82. Ricarte-Filho, J.C., M. Ryder, D.A. Chitale, M. Rivera, A. Heguy, M. Ladanyi, 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. **69**(11): p. 4885-93.

Resumo: Mutação BRAF em pacientes idosos submetidos à tireoidectomia

Introdução: As mutações BRAF representam a alteração genética mais comum do câncer de tireóide e esta foi a descoberta mais notável neste campo de pesquisa, nos últimos anos; estão presentes em 23-83% dos carcinomas papilíferos e são altamente específicas para este tipo histológico. **Casuística e Método:** estudamos 85 pacientes, com mais de 65 anos, submetidos à tireoidectomia, analisando a mutação BRAF V600E através de reação de PCR-RT realizada após a extração do DNA dos blocos de parafina. **Resultados:** conseguimos detectar a ausência ou presença da mutação BRAF V600E em 47 pacientes (55,3%), e ela foi considerada não analisável em 38 pacientes (44,7%). Entre os 17 carcinomas papilíferos estudados, 7 apresentavam a mutação (41,2%), e não encontramos a mutação BRAF em lesões histológicas benignas e malignas diferentes do carcinoma papilífero. Demonstramos associação estatística entre a presença desta mutação e a variante clássica do carcinoma papilífero além de tendência de associação entre o extravasamento tireoideano e a mutação BRAF. **Discussão:** Embora a mutação BRAF seja a anormalidade genética mais comum no carcinoma papilífero de tireóide, o seu significado prognóstico a longo prazo ainda não está bem estabelecido. Estudos contraditórios tem sido publicados, provavelmente pela heterogeneidade do carcinoma papilífero ao redor do mundo e diferentes fenótipos que se sobrepõem devido a alterações genéticas diferentes. **Conclusão:** a mutação BRAF, nos pacientes idosos, também é exclusiva do carcinoma papilífero e tem freqüência expressiva. Além disso, está relacionada com sua variante clássica e pode estar relacionada ao extravasamento tireoideano.

Descritores: 1. Glândula tireóide 2. Tireoidectomia 3. Neoplasias da glândula tireóide 4. Proteínas proto-oncogênicas B-raf 5. Mutação 6. Idoso

Abstract: BRAF mutations in the elderly submitted to thyroidectomy

Introduction: BRAF mutations are the most common genetic event in thyroid cancer and they are present in about 23-83% of papillary thyroid carcinoma. This mutation is highly specific of papillary histotype and it has been the most valuable finding in this research field during the last years. **Patients and Methods:** a series of 85 patients, older than 65 years, submitted to thyroid surgery, were included in this study. BRAF V600E mutation was analyzed by RT-PCR, following DNA extraction of paraffin embedded tissue section samples. **Results:** The BRAF mutation was analyzed in 47 patients (55,3%), and was not found in benign and malignant lesions different than papillary carcinoma. In 17 papillary carcinomas studied, 7 showed the mutation (41,2%). An association between the BRAF mutation and the classic variant of papillary hystotype was found in the present study, and a correlation harboring statistically significance was showed between extrathyroidal invasion and the presence of the mutation. **Discussion:** Although BRAF mutation is the most common genetic change in papillary thyroid carcinoma, its correlation with long term prognosis is not well established. Contradictory data has been published by different authors possibly due to the heterogeneity of the histological variants of papillary thyroid carcinoma. **Conclusion:** The BRAF mutation in the elderly is papillary cancer exclusive and show high frequency. Nevertheless it is correlated to the classic variant of papillary carcinoma and possibly with extrathyroidal invasion.

Keywords: 1. Thyroid gland 2. Thyroidectomy 3. Thyroid neoplasms 4. Proto-oncogene proteins B-raf 5. Mutation 6. Aged

Apêndice

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
Rua Santa Isabel, 305 – 4º andar Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo –SP
Fone Fax- 3337-0188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 28 de junho de 2007.

Projeto nº 116/07
Informe este número para
identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).
Dr.(a). Antonio Augusto Tupinambá Bertelli
Departamento de Cirurgia

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **25/04/2007** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Fatores prognósticos e de risco operatório do câncer de tireóide em pacientes geriátricos",** emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

[X] **Aprovado (inclusive o TCLE);**

[ ] **Com pendências** (há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias. Enviar as alterações em duas cópias);

[ ] **Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

[ ] **Não aprovado:** e

[ ] **Aprovado (**inclusive TCLE -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - ISCMSP