

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SIMONE ELISA DUTENHEFNER

Pesquisa da mutação T1799A do gene BRAF e a presença de metástases linfáticas no carcinoma papilífero da tireoide

São Paulo

2011

SIMONE ELISA DUTENHEFNER

Pesquisa da mutação T1799A do gene BRAF e a presença de metástases linfáticas no carcinoma papilífero da tireoide

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Alberto Rossetti Ferraz

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dutenhefner, Simone Elisa

Pesquisa da mutação T1799A do gene BRAF e a presença de metástases linfáticas no carcinoma papilífero da tireoide / Simone Elisa Dutenhefner. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Alberto Rossetti Ferraz.

Descritores: 1.Neoplasias da glândula tireoide 2.Carcinoma 3.Proteínas de proto-oncogene B-raf 4.Esvaziamento cervical 5.Metástases linfática

USP/FM/DBD-253/11

À minha mãe, com saudades, pois sem seu apoio e incentivo este trabalho
não seria possível.

Ao meu marido, pela sua compreensão e paciência ao longo desses anos de
dedicação.

Agradecimentos

Ao Professor Alberto Ferraz, que muito me ensinou por meio de seu exemplo de integridade moral e competência administrativa. Agradeço por permitir meu crescimento profissional e pelo apoio incondicional durante todas as situações adversas ao longo dos anos em que trabalhamos juntos.

A Dra. Suemi Marui, que acreditou no projeto e contribuiu significativamente com a realização das reações para a pesquisa genética.

Ao Dr. Celso Friguglietti pela co-orientação no trabalho, pelas críticas e incentivos, pelo carinho, amizade e pelo exemplo de perseverança e competência profissional.

Ao Professor Claudio Cernea e Drs. Fabio Montenegro e Evandro Mello pelas horas gastas com a aula de qualificação e contribuição para realização de um trabalho melhor.

Aos Drs. André Bandiera, José Brandão, Chin Lin, Milton Inoue, Daniel Marin pelo companheirismo, compreensão e apoio durante toda a realização do trabalho.

Ao Dr. Marcelo Durazzo pela paciência e amizade nos momentos difíceis.

Ao Professor Paulo Hoff e Professor Venâncio Alves por permitirem a utilização da estrutura de pesquisa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Ao Dr. Erivelto Volpi pelos conhecimentos cirúrgicos e exemplo de força de trabalho.

A Srta. Érika Urbano de Lima pela paciência e competência na realização das pesquisas da mutação.

A Dra. Christina Chiang e ao Dr. Iberê Soares pela disposição em colaborar com os exames anatomopatológicos.

A Srta. Julia Fukushima pela realização da estatística.

Ao meu pai e meus irmãos pelo amor e carinho sempre.

Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas chefiado pelo Prof. Lenine Brandão por proporcionar condições para a realização do estudo.

A todos os mestres e professores que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

*A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer
do seu próprio conhecimento.*

Platão

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed In Index Medicus*.

Sumário

1	Introdução.....	17
1.1	Objetivos.....	20
2	Revisão da literatura.....	21
2.1	A evolução do tratamento cirúrgico do câncer da tireoide e dos esvaziamentos cervicais	21
3	Casuística e métodos	33
3.1	Extração de DNA a partir de amostras obtidas em cirurgia	36
3.2	Extração de DNA a partir de material conservado em parafina	37
3.3	Quantificação de DNA.....	38
3.4	Amplificação por PCR	38
3.5	Sequenciamento automático.....	39
3.6	Reação de sequenciamento.....	39
3.7	Análise do sequenciamento	40
4	Resultados.....	41
4.1	Pesquisa da mutação T1799A (V600E) e fatores histopatológicos e estágio	43
4.2	Resultados entre a análise da presença de metástases linfonodais nos esvaziamentos eletivos e terapêuticos e fatores histopatológicos e estágio	47
5	Discussão	52
6	Conclusão.....	57
	Anexos	58
	Referências	64

Lista de figuras

Figura 1 - Níveis cervicais e seus limites	27
Figura 2 – Via da MAP Kinase	30

Lista de tabelas

Tabela 1 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e o sexo feminino <i>versus</i> sexo masculino e respectivas porcentagens.....	44
Tabela 2 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a idade dos pacientes e o tamanho das neoplasias em milímetros (mm)	44
Tabela 3 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de extensão extratireoidiana e respectivas porcentagens ...	45
Tabela 4 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de multicentricidade e respectivas porcentagens	45
Tabela 5 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e embolização angiolinfática e respectivas porcentagens.....	46
Tabela 6 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de metástases linfonodais e respectivas porcentagens	46
Tabela 7 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e estágio conforme classificação TNM da AJCC e respectivas porcentagens.....	47
Tabela 8 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e idade do paciente em anos e tamanho das neoplasias em mm	48
Tabela 9 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e a presença de multicentricidade e respectivas porcentagens.....	48
Tabela 10 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e a presença de embolização angiolinfática e respectivas porcentagens.....	49
Tabela 11 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e estágio conforme classificação TNM da AJCC e respectivas porcentagens.....	50

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Leitura do sequenciamento genético para pesquisa da mutação T1799A (V600E) do gene BRAF	35
Gráfico 2 – Distribuição das variantes histológicas	42
Gráfico 3 – Fatores de pior prognóstico avaliados no anatomopatológico	43
Gráfico 4 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de metástases linfonodais	46
Gráfico 5 – Análise entre a presença de metástases linfonodais e multicentricidade tumoral	49
Gráfico 6 – Análise entre a presença de metástases linfonodais e embolização angiolinfática.....	50
Gráfico 7 – Análise entre a presença de metástases linfonodais e estágio conforme classificação TNM da AJCC	51
Gráfico 8 – Regressão logística e construção de modelo preditor de metástases	51

Lista de abreviaturas e siglas

A – Adenina

AIT – Apical Iodide Transporter

AJCC – American Joint Committee on Cancer

ATA – American Thyroid Association

BRAF – Serine/threonine-protein Kinase B-Raf

CAPPESQ – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CAT – Carcinoma Anaplásico da Tireoide

CFT – Carcinoma Folicular da Tireoide

CMT – Carcinoma Medular da Tireoide

CPT – Carcinoma Papilífero da Tireoide

DAPK – Death-associated Protein Kinase

DNA – Deoxyribonucleic Acid

ERK – Extracellular Signal-regulated Kinase

ETA – European Thyroid Association

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GTP ligadora – Guanosine Triphosphate

ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

LATS – Latin American Thyroid Society

MAP Kinase – Mitogen-activated Protein Kinase

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

MMP – MetaloproteaseNIS – Sodium/Iodide Symporter (transportador sódio-iodo)

PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina

PCR – Polymerase Chain Reaction

RARbeta2 – Receptor beta2 de ácido retinoico

RAS – RAt Sarcoma (família de oncógenes primeiro identificada nos sarcomas murinos de Harvey (vírus do sarcoma do rato)

RET/PTC – Extracellular Signal-regulated Kinases/Papillary Thyroid Carcinoma

RIT – Radioiodoterapia

RNM – Ressonância nuclear magnética

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SLC5A8 – Sodium-coupled MonocarboxylateTransporter 1

SPSS3 – Statistical Package for the Social Sciences 3

T – Timina

Taq polimerase – *Thermus aquaticus*

TC – Tomografia Computadorizada

TIMP3 – Inibidor Tecidual de Metaloprotease 3

TNM – Tumor-Node- Mestastasis staging system

TPO – Tiroperoxidase

UICC – Union for International Cancer Control

US – Ultrassonografia

Lista de símbolos

μL – microlitro

mL – mililitro

mm – milímetros

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

rpm – rotações por minuto

μm – micrômetro

mg/mL – miligramas por mililitro

nm – nanômetro

$\mu\text{g/mL}$ – microgramas por mililitro

pmol – picomol

g – força G (medida de aceleração de um objeto em queda livre)

$\mu\text{g/L}$ – microgramas por litro

Resumo

DUTENHEFNER S. *Pesquisa da mutação T1799A do gene BRAF e a presença de metástases linfáticas no carcinoma papilífero da tireoide* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.

Muitos pacientes submetidos à tireoidectomia por Carcinoma Papilífero da Tireoide (CPT) têm doença linfonodal subclínica no momento da cirurgia. A mutação BRAF T17799A (V600E) é um evento comum no CPT e alguns estudos demonstram correlação entre a mutação e características de maior agressividade tumoral, incluindo a presença de metástases linfonodais. O esvaziamento eletivo do compartimento central ganha aceitação, uma vez que alguns estudos evidenciam que a presença de metástases linfonodais aumenta o risco de recidiva e mortalidade. Devido ao grande potencial de complicações do esvaziamento do compartimento central, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre a presença da mutação BRAF T17799A (V600E), a presença de metástases linfonodais e fatores clínicos e histopatológicos de pior prognóstico. Métodos: 51 casos consecutivos de pacientes com CPT foram submetidos à tireoidectomia total e ao esvaziamento eletivo ou terapêutico do compartimento central. Em todos os pacientes foi pesquisada a mutação BRAF T17799A (V600E) no tecido tireoidiano com Carcinoma Papilífero de Tireoide. Resultados: Cinquenta e quatro por cento (54,9%) dos pacientes apresentaram metástases linfonodais. Seis pacientes apresentaram metástases laterais confirmadas por punção aspirativa por agulha fina no pré-operatório e 22 pacientes (43%) apresentaram metástases não detectadas no pré ou no intra operatório. A mutação BRAF T17799A (V600E) foi encontrada em 15 pacientes portadores de CPT (29,4%). A presença da mutação não teve associação estatisticamente significativa para sexo, idade, tamanho do tumor, extensão extratireoidiana, multicentricidade, embolização angiolímfática e metástases linfonodais. As metástases linfonodais se associaram à multifocalidade ($p = 0,005$) e invasão angiolímfática ($p = 0,003$) na análise univariada. Conclusão: A presença da mutação BRAF T17799A (V600E) não se associou à metástases linfonodais em nosso estudo. A multifocalidade e a detecção de invasão angiolímfática no CPT foram os fatores mais importantes na predição de metástases linfonodais.

Descritivos: neoplasias da glândula tireoide, carcinoma, oncogenes, proteínas de proto-oncogene B-raf, esvaziamento cervical, metástases linfática.

Abstract

DUTENHEFNER S. *Analysis of the T1799A BRAF mutation and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma* [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.

Background: Many patients undergoing thyroidectomy for Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) have subclinical node disease at the time of surgery. The BRAF T17799A (V600E) mutation is a common event in PTC and some studies have demonstrated a correlation between the mutation and aggressive characteristics including lymph node metastasis. Prophylactic Central Node Dissection (CND) is gaining acceptance in the treatment of PTC as studies have shown nodal disease increases local recurrence and may alter mortality. Given the potential complications of CND, the aim of this study was to determine the correlation among BRAF mutation, lymph node metastasis and clinical and histopathological factors of worse prognosis.

Methods: A total of 51 consecutive cases of patients with PTC underwent total thyroidectomy and routine prophylactic (CND) or therapeutic neck dissection when metastases were found. All patients were tested for the BRAF mutation.

Results: Overall, positive lymph nodes were found in Fifty four per cent 9% of patients. Six patients had lateral metastases confirmed by fine needle aspirative cytology and 22 patients (43%) had occult metastases. The BRAF mutation was found in 15 patients (29.4%). BRAF was not correlated with sex, age, size of tumor, multifocality, extrathyroid extension or lymph node metastases. Lymph node metastases were correlated with multifocality ($p = 0.005$) and angiolymphatic invasion ($p = 0.003$) in univariate.

Conclusions: The BRAF mutation was not correlated with lymph node metastases in our study. Multifocality and angiolymphatic invasion were important factors for predicting lymph node metastases.

Descriptions: thyroid neoplasms, carcinoma, oncogenes, proto-oncogene proteins B-raf, neck dissection, lymphatic metastasis.

1 Introdução

Os principais tipos histológicos do câncer da tireoide são: Carcinoma Papilífero (CPT), Carcinoma Folicular (CFT), Carcinoma Medular (CMT) e Carcinoma Anaplásico (CAT).

O Carcinoma Papilífero da Tireoide (CPT) é a neoplasia maligna derivada das células foliculares da tireoide, mais comum entre as neoplasias endócrinas. O aumento da incidência do câncer de tireoide está ocorrendo em diversas populações, e se deve principalmente ao aumento de casos de carcinoma papilífero (1-4). As neoplasias bem diferenciadas da tireoide, incluindo o carcinoma papilífero, geralmente apresentam um comportamento indolente e curável. Entretanto, uma significativa taxa de recorrência em torno de 20% em 10 anos e 30% em 30 anos, pode ser observada após o tratamento inicial (5).

O tratamento convencional por meio de cirurgia e em alguns casos pela radioiodoterapia (RIT) complementar é curativo para a maior parte dos pacientes. Porém, existem alguns pacientes que apresentam recidivas loco-regionais ou à distância e alguns acabam indo a óbito pela doença. Os pacientes são considerados incuráveis quando a doença se torna inoperável ou quando ela perde sua avidéz pelo iodo (6).

Possivelmente, uma melhor estratificação de risco dos pacientes pode ser benéfica ao ajudar na opção por tratamentos mais ou menos agressivos, de modo a diminuir o risco de recidiva e mortalidade pela doença.

A fim de estabelecer condutas padronizadas, foram publicadas diretrizes para o manejo do câncer da tireoide. Essa iniciativa partiu das mais importantes sociedades mundiais: American Thyroid Association (ATA) (7), European Thyroid Association (ETA) (8) e Latin American Thyroid Society (LATS) (9). As diretrizes têm tanto o intuito de estratificar o risco de recidiva e mortalidade das neoplasias, quanto de padronizar o tratamento cirúrgico e a radioiodoterapia. O tratamento dos linfonodos do

compartimento central foi tema de um tópico específico das diretrizes da American Thyroid Association em 2009.

A incidência de metástases linfonodais no carcinoma papilífero no compartimento central e no compartimento lateral foi estudada em algumas populações (10). Na população japonesa, por exemplo, a incidência encontrada de metástases linfonodais não detectadas clinicamente, mas após a remoção cirúrgica e análise histopatológica chegou a 80% (11-12).

Como ainda não existem métodos pré-operatórios confiáveis para a detecção dessas metástases (13-14) e, por outro lado, a morbidade do esvaziamento do compartimento central ser significativamente maior em relação à realização da tireoidectomia isolada, a indicação do esvaziamento eletivo permanece controversa. Na última edição das diretrizes da ATA (7) foi sugerido que as neoplasias classificadas pela Union for International Cancer Control (UICC) como T3 e T4, podem ser submetidas ao esvaziamento eletivo do compartimento central.

Na tentativa de estratificar o risco das neoplasias de tireoide, vários sistemas de classificação e vários fatores clínicos, histopatológicos e recentemente moleculares têm sido correlacionados com pior prognóstico. Recentemente a mutação T17799A (V600E) do gene BRAF foi correlacionada com vários fatores de mau prognóstico, inclusive com uma maior incidência de metástases linfonodais (15-25). Todos os estudos revisados para a realização da tese são retrospectivos e, em sua maioria, realizados em pacientes submetidos apenas ao esvaziamento terapêutico.

Como a realização dos esvaziamentos eletivos permanece controversa, pois mesmo com essa incidência altíssima de micrometástases linfonodais os pacientes não submetidos ao esvaziamento eletivo geralmente têm boa evolução (11-12), é pertinente haver uma maneira de selecionar casos que possivelmente terão uma evolução pior, com risco de recidiva central e conseqüentemente maior morbidade nas reoperações. Deve-se, ainda, levar em consideração que o esvaziamento cervical

realizado por mãos menos experientes pode causar grande dano ao paciente, ocasionando o hipoparatiroidismo definitivo e a lesão de nervo laríngeo inferior.

Ao realizar a revisão da literatura pode-se identificar várias fases do tratamento do câncer da tireoide. Após a padronização da técnica da tireoidectomia, quando a cirurgia passou a ter índices de complicações aceitáveis, e com o aumento do diagnóstico das neoplasias malignas da tireoide, a tireoidectomia parcial se tornou o tratamento mais utilizado. A seguir, houve uma mudança em relação ao tratamento cirúrgico e em uma segunda fase, tem-se a tireoidectomia total realizada com muito mais liberalidade. Na medida em que o tratamento cirúrgico adotado passou a ser a tireoidectomia total e o tratamento com iodoterapia adjuvante se mostrava benéfico no controle local e na sobrevida, teve-se grande parte dos pacientes tratados dessa forma.

Atualmente, existe uma tendência a individualizar a conduta baseando-se em estratificação de risco e avaliando-se o custo-benefício do tratamento. Portanto, pacientes caracterizados doentes de baixo risco, podem ser tratados de maneira menos agressiva, tanto do ponto de vista cirúrgico quanto do ponto de vista do tratamento com iodo.

Os conhecimentos adquiridos em relação à mutação T17799A (V600E) ainda são muito recentes e, enquanto sua aplicação no diagnóstico do CPT é bastante clara, no que se refere a prever o prognóstico dos pacientes, permanece obscura.

Em relação à população brasileira ainda há poucas informações e nenhum estudo prospectivo envolvendo a pesquisa da mutação T17799A (V600E) e o esvaziamento eletivo foi realizado. O desenvolvimento deste estudo intui reunir dois grandes tópicos do estudo do câncer da tireoide, a saber: o estudo dos padrões de disseminação linfática da doença com a pesquisa da mutação genética.

1.1 Objetivos

Avaliar os fatores clínicos e histopatológicos de pior prognóstico associados à presença da mutação T17799A (V600E), dando-se ênfase à associação entre a mutação e a presença de metástases linfonodais em pacientes submetidos ao esvaziamento cervical eletivo e terapêutico.

2 Revisão da literatura

2.1 A evolução do tratamento cirúrgico do câncer da tireoide e dos esvaziamentos cervicais

Em comunidades onde o bócio era endêmico, o paciente era considerado inoperável e a condição era fatal até meados do século 19. Nesse contexto, a morte geralmente decorria da insuficiência respiratória.

Apesar da percepção das áreas endêmicas em 1789 e da descrição da Doença de Graves em 1835, foi apenas em 1856 que Moritz Schiff, fisiologista em Genebra, demonstrou que a extirpação da glândula tireoide em cães levava a uma série de eventos e alterações, que culminavam com a morte do animal, desse modo a glândula seria responsável por uma secreção vital ao organismo. Em 1880 Ivar Sandström descreve pela primeira vez as glândulas paratireoides. A cirurgia da tireoide era considerada proibitiva por seu altíssimo índice de mortalidade (40%) e reservada para pacientes que não possuíam alternativa. Existia o medo da hemorragia, mas a infecção constituía a principal causa de mortalidade. Três fatores contribuíram para a possibilidade de realizar eficientemente a tireoidectomia: a melhora dos métodos anestésicos, a profilaxia das infecções e o desenvolvimento dos instrumentos de hemostasia. Uma das figuras pioneiras na história da cirurgia da tireoide foi Theodor Billroth, que conseguiu diminuir o índice de mortalidade para 8,3%, utilizando técnicas de antisepsia e instrumentos hemostáticos. Mas a cirurgia da tireoide teve seu grande expoente em Theodor Kocher. Ao longo de sua carreira como professor da Universidade de Berna, ele diminuiu a mortalidade da tireoidectomia para menos de 0,5% em 5.000 casos operados e ganhou o prêmio Nobel em 1909 por seu trabalho com a fisiologia, patologia e cirurgia da glândula tireoide (26).

Em 1906, George Crile (27) padronizou o esvaziamento cervical para as neoplasias em Cabeça e Pescoço de modo geral, incluindo cuidados com a hemostasia e aspiração oro-traqueal. O esvaziamento cervical descrito por Crile, denominado radical clássico, compreende os níveis cervicais de I a V.

Os níveis cervicais são anatomicamente divididos da seguinte maneira: Nível I ou submandibular, tem seus limites dados pelo músculo digástrico e a mandíbula; Nível II ou Júgulo-carotídeo superior, tem seus limites dados pelo músculo digástrico, borda posterior do músculo esternocleidomastoideo, bifurcação carotídea inferiormente e artéria carótida medialmente; Nível III ou Júgulo-carotídeo médio, tem seus limites dados pela bifurcação carotídea superiormente, artéria carótida medialmente, borda posterior do músculo esternocleidomastoideo e músculo omo-hioide; Nível IV ou Júgulo-carotídeo inferior, tem seu limites dados pelo músculo omo-hioide, borda posterior do músculo esternocleidomastoideo, clavícula e artéria carótida; e Nível V ou fossa supraclavicular, compreende os linfonodos entre a borda posterior do músculo esternocleidomastoideo, a clavícula e o músculo trapézio.

As histórias da cirurgia da tireoide e dos esvaziamentos cervicais acontecem simultaneamente. Isso provavelmente ocorre porque as principais motivações para o desenvolvimento da cirurgia da tireoide são os casos de hipertireoidismo e de bócios volumosos, raramente existe a menção ou a preocupação com as neoplasias de tireoide à época de Billroth ou Kocher. Em relação aos esvaziamentos cervicais, as principais motivações são as neoplasias da cavidade oral e do trato aerodigestivo superior. A preocupação com o tratamento dos linfonodos metastáticos das neoplasias da tireoide começa a surgir em 1950, em publicação de Cattell da Lahey Clinic em Boston (28).

No entanto, é no Japão, depois da Segunda Guerra Mundial, que surgem trabalhos com casuísticas de pacientes tratados não apenas com a tireoidectomia, mas também com o esvaziamento cervical eletivo, tanto do

compartimento central quanto dos compartimentos laterais. O esvaziamento cervical eletivo é definido como o esvaziamento de um compartimento, com limites anatômicos bem definidos, na ausência de evidências clínicas e radiológicas de metástases linfonodais. Por outro lado, o esvaziamento terapêutico é aquele realizado quando já se tem a comprovação da presença da metástase. Como o Japão foi vítima do ataque nuclear durante a Segunda Guerra, os tratamentos com iodo radioativo ficam muito restritos, além da presença de um grande número de metástases linfonodais encontrado ao longo do tratamento, favorecendo um tratamento cirúrgico mais agressivo.

Em 1970, Noguchi (11-12) publica sua casuística com 57 casos submetidos à tireoidectomia e esvaziamento cervical das cadeias laterais bilateralmente e das cadeias paratraqueais e pré-traqueais. Dentre os 57 casos, 33 pacientes não tinham diagnóstico de metástases linfonodais no pré ou no intraoperatório. O índice de metástase encontrado foi de 82%. Em sua maioria, as metástases encontradas tinham menos de 3 mm. O padrão de disseminação linfonodal também foi avaliado, evidenciando que quando a quantidade de doença linfonodal era menor, as metástases ocorriam para as cadeias pré-traqueais, recorrentiais e Júgulo-carotídeas inferiores. Porém, quando havia doença linfonodal extensa, os níveis superiores também poderiam estar acometidos.

Nessa mesma publicação, Noguchi já discute o valor do esvaziamento eletivo, uma vez que ele compara seus próprios pacientes submetidos e não submetidos ao esvaziamento, e encontra índices de sobrevida semelhantes. Ele também sugere que metástases pequenas tendem a regredir após a remoção do tumor primário, pela ação do próprio sistema imunológico do paciente e que não haveria impacto na sobrevida realizar o esvaziamento eletivo nos pacientes com metástases microscópicas.

Em 1986, a Mayo Clinic publica um estudo retrospectivo com 859 pacientes com CPT tratados entre 1946 e 1970 (29). Foram encontrados 7%

de metástases linfonodais detectadas clinicamente, 6 % de recidiva local e 5% de metástases à distância. Em pacientes sem extensão extratireoideana, recidiva no pós-operatório e metástase à distância no pós-operatório resultaram em 17 e 41% de mortalidade respectivamente. Os pacientes que tinham neoplasias com extensão extratireoideana e apresentaram recidivas, tiveram índices de mortalidade ainda maiores. Posteriormente, em 2002 (30), a Mayo Clinic publica sua casuística atualizada, evidenciando 40% de metástases linfonodais diagnosticadas durante o tratamento cirúrgico inicial e que o tratamento com RIT em pacientes de baixo-risco não trouxe benefícios.

Porém, no final da década de 70 e início da década de 80, o tratamento do CPT muda significativamente com as publicações de Mazzaferri (31) e com a introdução das dosagens de tireoglobulina (32) no pós-operatório. Mazzaferri publica estudo retrospectivo com 576 pacientes e conclui que o tratamento com tireoidectomia seguido de radioiodo e hormônio supressão apresentou menores índices de recidiva e mortalidade, com exceção dos pacientes que possuíam neoplasias com menos de 1,5 cm de diâmetro em sua maior extensão. Esses não tiveram benefício, recebendo um tratamento mais agressivo.

Torna-se muito mais liberal a indicação do tratamento por meio da RIT, com evidências de menores índices de recidiva e mortalidade. O tratamento com iodo permite a não realização do esvaziamento eletivo com maior segurança. Em contrapartida, a procura por recidivas locais e à distância pela detecção do aumento dos níveis de tireoglobulina se torna uma rotina.

Em 1991, a American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery publica uma classificação dos níveis cervicais, incluindo pela primeira vez o nível VI ou compartimento central com seus limites anatômicos (33).

Sugino, em 1995, (34) publica sua casuística com 746 pacientes submetidos à tireoidectomia e esvaziamento cervical bilateral, evidenciando que os principais fatores envolvidos com recidivas linfonodais são a idade do paciente, sendo que os extremos são mais favoráveis às recidivas; e o sexo masculino, que também apresenta maior índice de recidivas linfonodais.

Em 1996, Hughes (35) publica estudo retrospectivo com 200 pacientes tratados no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, sendo que 100 possuíam evidência de metástases linfonodais e 100 não as possuíam, mesmo assim e observou sobrevidas iguais, porém com maior risco de recidiva loco-regional no paciente com diagnóstico de metástase no tratamento inicial.

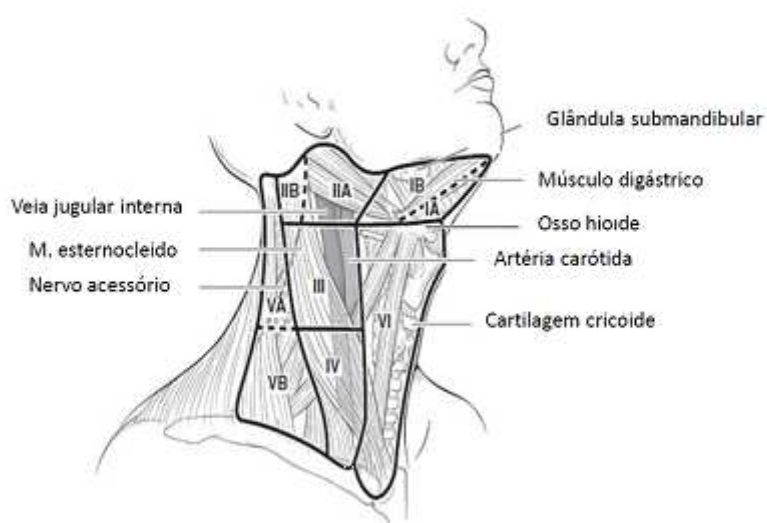
Em 2003, Wada (36) publica sua casuística com 259 microcarcinomas papilíferos da tireoide com 64,1% de metástases linfonodais no compartimento central e 44,5% com metástases no compartimento lateral. Durante o seguimento também se observou que os pacientes submetidos ao esvaziamento eletivo e os não submetidos ao esvaziamento tiveram os mesmos índices de recidiva. Em 2007, Wada (37) publica uma série de 134 casos, sendo que 42 foram submetidos ao tratamento do CPT com tireoidectomia e esvaziamento terapêutico e 92 foram submetidos à tireoidectomia e ao esvaziamento eletivo. Sessenta e nove por cento % dos pacientes apresentavam metástases linfonodais no compartimento central. Houve diferença significativa para recidiva tanto local quanto à distância para os pacientes que apresentavam metástases linfonodais, porém, não houve diferença para morte relacionada à doença entre o grupo que apresentava metástases e o grupo que não apresentava metástases. A idade foi o fator que se relacionou com maior chance de recidiva, além da presença de metástases.

Em 2006, Lundgren (38) publica estudo com 5554 casos avaliados por meio do Registro de Câncer da Suécia. Nesse estudo é demonstrado

que a chance de morrer por um CPT é maior quando se tem o diagnóstico de metástase linfonodal no momento do tratamento inicial.

A melhora da sensibilidade dos métodos de imagem, ultrassonografia cervical (US), tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM), associada aos ensaios de tireoglobulina cada vez mais sensíveis, fez com que exista a possibilidade de se detectar recidivas cada vez menores; ao somarmos isso aos grupos japoneses com sua grande experiência em esvaziamentos extensos, a Mayo Clinic realizando o esvaziamento eletivo do compartimento central de rotina e o estudo de Lundgren com uma extensa casuística mostrando diferença entre mortalidade de pacientes submetidos aos procedimentos mais restritos, abriu-se margem para a discussão sobre a realização do esvaziamento eletivo. Em 2006, nas diretrizes da ATA (39) a recomendação 27 é de que o esvaziamento do compartimento central deve ser considerado para todos os pacientes com diagnóstico de CPT. A recomendação ainda coloca como alternativa ao esvaziamento, o tratamento com tireoidectomia total seguida da RIT.

Nas diretrizes da ATA de 2009 (7) é visto uma grande preocupação em estadiar o paciente no pré-operatório de maneira adequada, utilizando-se o US cervical como rotina e puncionando-se linfonodos suspeitos (recomendação 21). É também reforçada a definição do compartimento central: “o compartimento central contém a tireoide e os nódulos adjacentes sendo limitado superiormente pelo osso hioide, inferiormente pela artéria inominada (tronco braquicefálico) e lateralmente por cada bainha carotídea. Os linfonodos abaixo da artéria inominada seriam denominados Nível VII ou mediastinais superiores” (Figura1).



FONTE: American Thyroid Association, 2009 (7), p. 1178. (adaptada)

Figura 1 - Níveis cervicais e seus limites

A ATA leva em consideração para suas diretrizes dois trabalhos, a saber: o de Ito (40) publicado em 2006, em que o autor avalia 759 pacientes e encontra 63% de metástases no compartimento central em pacientes com foco único de neoplasias de tireoide, sendo que a frequência de metástases foi relacionada com o tamanho da neoplasia. No compartimento lateral foram encontrados 62% de metástases também com frequência relacionada ao tamanho da neoplasia. Foi ainda observado que tumores com mais de 1,0 cm e com metástases no compartimento central tinham maior chance de recidiva e que tumores com mais de 1,0 cm tinham uma chance maior de terem metástases na cadeia recorrential contralateral.

No trabalho de Dralle (41), no qual havia 366 pacientes com CPT e 134 com CFT. 40,2% dos pacientes com CPT apresentavam metástases linfonodais, e houve uma importante associação entre o tamanho da neoplasia e metástases linfonodais e a extensão extratireoideana nos CPTs

em detrimento aos CFTs. Já em relação às metástases à distância, houve uma maior prevalência nos CFTs.

A Recomendação 27 indica o esvaziamento terapêutico do compartimento central sempre que houver evidência de metástases linfonodais centrais ou laterais e com relação ao esvaziamento eletivo, que ele pode ser realizado, principalmente nos casos dos tumores maiores (T3 e T4). Existe ainda uma observação de que essas recomendações devem ponderar a experiência do cirurgião na realização desses esvaziamentos, a fim de que não haja pior custo-benefício para o paciente em questão.

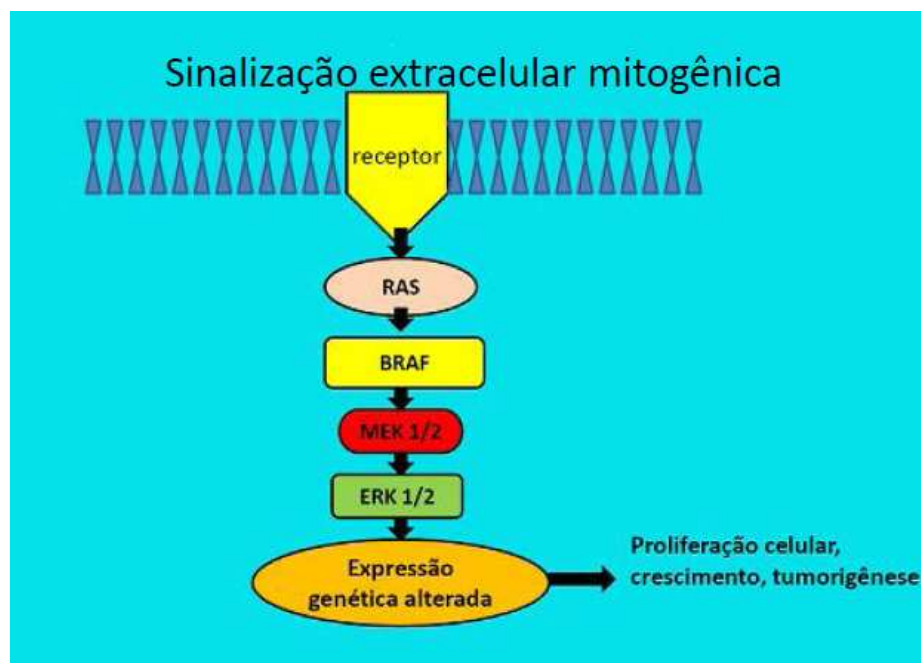
Após a publicação das diretrizes e dos limites do compartimento central, houve ainda uma preocupação maior em se padronizar o conceito de esvaziamento eletivo e de como deveria ser realizado e descrito o procedimento cirúrgico em questão. Orloff (42) e o próprio grupo de trabalho da ATA (43) voltam a reforçar o conceito de que esvaziamento eletivo seria aquele em que os linfonodos metastáticos não foram identificados no pré-operatório ou no intraoperatório durante a inspeção e palpação cirúrgica. É também reforçado que o esvaziamento deve ser do compartimento e não apenas a remoção de linfonodos. Além disso, o procedimento mínimo a ser realizado deve ser a remoção das cadeias pré-traqueais, pré-laríngeas e pelo menos uma das cadeias recorrenciais. Na descrição cirúrgica, deve ser mencionado se o esvaziamento realizado foi unilateral ou bilateral, conforme as cadeias recorrenciais removidas.

Também em 2009, Ito (44) publica 631 casos submetidos ao tratamento com tireoidectomia e esvaziamento cervical do compartimento central de rotina, nos quais a mutação BRAF foi pesquisada e encontrada em 38,4% dos casos, mas na qual não houve correlação com metástases linfonodais, extensão extratireoidiana, idade mais avançada, metástases à distância no momento da cirurgia ou estágio. O trabalho de Ito além de retrospectivo foi o único encontrado na literatura no qual houve a intenção de

avaliar a presença da mutação do BRAF e a presença de metástases no compartimento central em esvaziamentos feitos de modo eletivo.

2.2 A história da mutação T1799A

A via da MAP Kinase é uma clássica sinalização intracelular, responsável por funções intracelulares, como proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência, e quando ativada de forma aberrante se torna tumorigênica (Figura 2). A ativação normal da via é feita por diversos fatores de crescimento, como hormônios e citocinas que se ligam aos receptores de membrana. Em células normais a ativação da RAF kinase ocorre por meio de uma interação direta com a GTP-ligadora de RAS. Quando a RAF kinase é ativada, ela fosforila e ativa MEK, que por sua vez fosforila e ativa ERK. A ERK ativada fosforila proteínas nucleares que alteram a expressão genética e o comportamento celular. Existem três tipos de RAF kinase: A-Raf, B-Raf (BRAF) e C-Raf. Entre as três, BRAF é a mais potente ativadora da via da MAP kinase (6).



FONTE: Xing (6), 2007, p. 762. (adaptada)

Figura 2 – Via da MAP Kinase

Desde a descoberta das mutações do gene BRAF em cânceres humanos, mais de 40 mutações foram descritas, entre elas a mutação T1799A. Essa mutação é a mais comum, estando presente em mais de 90% dos casos. Ela consiste em uma transversão de “T” para “A” na posição T1799, resultando em uma substituição de valina por glutamato no resíduo 600(45-47).

O primeiro relato sobre a mutação T1799A (V600E) foi descrito para nevus melanocítico em 2003, sugerindo que a mutação seria um passo crucial na gênese do melanoma cutâneo (48). Ainda em 2003, houve a primeira publicação de Kimura (49) evidenciando a presença da mutação em uma proporção significativa dos CPTs e realizando a análise concomitante das mutações do RAS e RET/PTC. Foram avaliados 124 tumores, desses 78 eram CPTs. Foram encontradas mutações do gene BRAF em 28 casos (36%), sendo todas as mutações em carcinomas papilíferos. Não foram

encontrados dois tipos diferentes de mutações no mesmo tumor e, portanto, ficou claro que as mutações são excludentes.

No mesmo ano, a correlação da mutação T1799A (V600E) com pior prognóstico foi descrita por Namba (50). O autor observou maior incidência de metástases à distância e pior estágio clínico.

Os estudos já se encaminhavam para essa conclusão, mas foi Nikiforova (51) em 2003 que ao analisar 320 tumores, publicou o estudo confirmando que a mutação é exclusiva dos carcinomas papilíferos, dos carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos que se originaram a partir de um carcinoma papilífero e, portanto, a mutação poderia ser utilizada para fins diagnósticos. As variantes clássica e células altas estão mais associadas à mutação, ao contrário da variante folicular. Sedliarou (52) ao analisar 46 casos em 2004, encontra a mutação em 28,2% em microcarcinomas, ou seja, nos carcinomas com menos de 1 cm de diâmetro e, portanto, conclui-se que a mutação ocorre em estágios muito precoces da doença.

Em 2004, surge a perspectiva de realizar a detecção da mutação no produto da Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) e assim obtem-se a informação a respeito da mutação no pré-operatório. Cohen (53) analisa 95 CPTs excisados e suas respectivas punções e em 38% dos casos obtem a mutação na punção com 94% de concordância.

A partir de 2005, começam a surgir estudos contraditórios com relação à associação entre a mutação T1799A (V600E) e pior prognóstico. Trovisco e Liu (54-55) relatam não haver associação com tamanho, invasão angiolinfática, extensão extratireoidiana, multicentricidade e metástases linfonodais. Por outro lado, Xing (25) encontra associação tanto com extensão extratireoidiana quanto com metástases linfonodais e estágio avançado. Xing também associa a mutação à menor avidéz por iodo e falência do tratamento da doença recidivada. Apesar das crescentes controvérsias nos estudos clínicos, Mesa (56) em 2006 publica um estudo

experimental demonstrando a alteração da matriz extracelular induzida pela mutação T1799A (V600E), sendo que as metaloprotease (MMP) 3, MMP9 e MMP13 estavam mais expressas. Hu (57) demonstra que existe a metilação de vários genes supressores de tumor associados ao BRAF, incluindo inibidor tecidual de metaloproteiase 3 (TIMP3), SLC5A8, death-associated protein kinase (DAPK) e o receptor beta2 de ácido retinoico (RARbeta2). Esses genes também estariam associados a um pior prognóstico.

Em 2007 estudos confirmam a alteração da metabolização do iodo nas células com a mutação T1799A (V600E). Durante (58) publica a redução significativa da expressão dos genes: sodium/iodide symporter (NIS), apical iodide transporter (AIT) e tiroperoxidase (TPO).

Em 2009, Cerutti (18) publica uma série com 120 casos, na qual a prevalência da mutação nos carcinomas papilíferos da população brasileira estudada foi de 48%. Houve associação com extensão extratireoideana, metástases linfonodais, recidiva da doença e morte pela doença. Cerutti ainda observa marcada diminuição da expressão de NIS nas neoplasias com a mutação. No mesmo ano inicia-se a ideia de que ter o conhecimento prévio da mutação ajuda no planejamento cirúrgico, no que se refere à extensão da tireoidectomia e, possivelmente, a extensão da dissecação linfonodal (59).

3 Casuística e métodos

O estudo de número **4310**, projeto CAPPesq nº **0866/09** foi aprovado pela comissão de ética do hospital (CAPPEsq). Todos os pacientes selecionados para o estudo foram informados e assinaram o termo de consentimento.

Os critérios de seleção foram os seguintes: pacientes com nódulos tireoidianos com ultrassonografia cervical e PAAF suspeitos para CPT ou já com o diagnóstico de CPT. Os pacientes selecionados não haviam sido submetidos a nenhum tratamento cirúrgico prévio. A presença de metástases linfonodais na investigação inicial não foi considerada um critério de exclusão.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com condições clínicas que favorecessem o hipoparatiroidismo no pós-operatório ou que trouxessem risco de descompensação clínica da doença de base pelo hipoparatiroidismo.

Foram selecionados consecutivamente 54 pacientes cuja PAAF apresentava diagnóstico de carcinoma papilífero ou suspeito para carcinoma papilífero, entre abril de 2009 e agosto de 2010. Todos os pacientes foram atendidos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e foram operados pela mesma equipe. Também foram submetidos à tireoidectomia total com a confirmação do diagnóstico de carcinoma papilífero pelo exame de congelação. A partir da confirmação do diagnóstico de CPT, os pacientes que não possuíam diagnóstico prévio clínico e ultrassonográfico de metástases linfonodais e não apresentavam metástases no intraoperatório, foram submetidos ao esvaziamento eletivo do compartimento central bilateral, enquanto os pacientes que possuíam diagnóstico de metástases linfonodais confirmadas

pela PAAF ou congelação foram submetidos ao esvaziamento terapêutico do compartimento acometido e do compartimento central.

Os esvaziamentos cervicais foram realizados de acordo com os parâmetros anatômicos definidos pela ATA e American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (7).

Três pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem problemas clínicos associados que poderiam provocar complicações graves no pós-operatório: uma paciente com diagnóstico de esquizofrenia e duas pacientes com antecedente de gastroplastia.

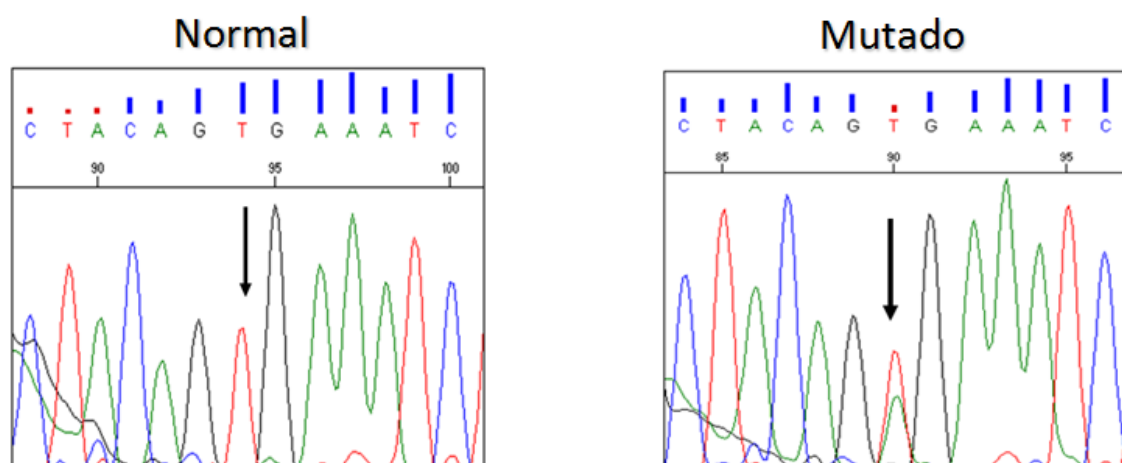
Todas as peças foram avaliadas pelo Serviço de Patologia do ICESP, de forma padronizada e seguindo protocolo da Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. Os produtos das tireoidectomias foram fixados e submetidos a cortes seriados no sentido transversal com espaçamento de 3 a 5 mm entre eles. Os cortes foram realizados no sentido cranial para caudal. Assim, toda a tireoide foi incluída no estudo de parafina, possibilitando a detecção de múltiplos focos de neoplasia, mesmo que sejam focos microscópicos. Os produtos dos esvaziamentos cervicais foram enviados separados da tireoide, a qual foi submetida ao exame de congelação previamente ao esvaziamento. Os esvaziamentos cervicais foram dissecados manualmente pelo patologista.

Inicialmente a coleta do material foi realizada em material de PAAF, porém essa rotina se mostrou extremamente complicada, justamente pela falta da adesão dos pacientes (recusa a serem submetidos a uma nova PAAF ou dificuldade para locomoção ao local do exame). Optou-se, então, por realizar a pesquisa em material de parafina e o método foi padronizado para todos os pacientes.

A pesquisa da mutação T1799A (V600E) foi realizada em todos os focos com tamanho igual ou maior do que 5 mm, mesmo nos casos em que havia multicentricidade. A coleta do material foi obtida durante a cirurgia ou a

partir de material parafinado. Do material obtido na cirurgia, uma parte foi enviada para exame de congelação e outra colocada em tubo Eppendorf e armazenada em nitrogênio líquido até a sua utilização. A seleção dos blocos para a extração realizada por um único patologista (Dra. Christina Chiang) pertencente ao Serviço de Patologia do ICESP. De cada bloco representando um foco de neoplasia nove cortes de 10 µm foram feitos e distribuídos igualmente em 3 tubos de Eppendorf e armazenados a -20°C até a sua utilização. Todas as etapas da pesquisa da mutação genética foram realizadas pela aluna de mestrado Érika Urbana de Lima (Gráfico 1) no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 25, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Gráfico 1 – Leitura do sequenciamento genético para pesquisa da mutação T1799A (V600E) do gene BRAF



A análise estatística foi realizada pelo Setor de Apoio à Pesquisa do ICESP, utilizando-se o programa Statistical Package for the Social Sciences 3 (SPSS3) e partindo-se do princípio de que as variáveis sexo, idade, tamanho da neoplasia e a presença da mutação T1799A (V600E) do gene BRAF, poderiam prever a presença de metástases linfonodais. Também foi analisado se extensão extratireoidiana, embolização angiolinfática e multicentricidade estariam associadas à metástases linfonodais ou à presença da mutação T1799A (V600E).

Avaliou-se, ainda, a associação entre a presença da mutação e o estadiamento TNM, para esse procedimento foi utilizada a sétima edição do *Manual de Estadiamento de Câncer* da American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Foram feitas as análises univariada e multivariada. As análises univariadas foram realizadas por meio do Teste Exato de Fisher, do Teste de Mann-Whitney e Teste da Razão de Verossimilhança. A análise multivariada foi realizada por meio da regressão logística. Foram considerados estatisticamente significativos, resultados com $p < 0,05$.

3.1 Extração de DNA a partir de amostras obtidas em cirurgia

A extração do DNA das amostras obtidas em cirurgia foi realizada utilizando-se o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Chatsworth, CA. 180 μ L do Buffer ATL e 20 μ L de Proteinase K foram adicionados a 1,0 grama de neoplasia e colocados em um tubo de 1,5 mL. As amostras foram homogeneizadas no vortex durante 15 segundos, e incubadas *overnight* a 56°C. Foram adicionados mais 200 μ L do Buffer AL e novamente homogeneizado no vortex durante 15 segundos. Adicionou-se 200 μ L de etanol 100%, homogeneizados por vortex durante 15 segundos, incubados por cinco minutos à temperatura ambiente (15-25°C). O material foi transferido para a Coluna MinElute QIAamp e centrifugado a 8000 rpm por um minuto. Adicionou-se 500 μ L do Buffer AW1, seguida de centrifugação a 8.000 rpm por um minuto. A coluna foi transferida para um tubo de 2 mL limpo e adicionados 500 μ L do Buffer AW2 e centrifugados a 8.000 rpm por um minuto. Novamente as colunas foram transferidas para um tubo de 2 mL limpo. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante três minutos para que a membrana pudesse secar completamente. As colunas foram transferidas para um tubo limpo de 1,5 mL, aplicou-se 20 μ L do Buffer AE e,

em seguida, foram incubadas à temperatura ambiente (15-25°C) por cinco minutos e, posteriormente, centrifugadas a 14.000 rpm por um minuto.

3.2 Extração de DNA a partir de material conservado em parafina

Foram obtidas três secções equivalentes a 10 µm para cada microtubo de Eppendorf de 1,5 mL. A esses tubos foram adicionados 1,0 mL de xilol pré-aquecido em estufa a 95°C. Os microtubos foram agitados e colocados em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida centrifugados por cinco minutos a 15.000 xg, posteriormente o sobrenadante foi descartado. Para eliminação eficaz da parafina, esse passo foi repetido por mais duas vezes. As amostras foram então submetidas a duas lavagens com 500 µL de etanol absoluto para a retirada do solvente orgânico. Após cada adição de etanol absoluto, os microtubos foram centrifugados por cinco minutos, a 13.000 xg a 4°C e o sobrenadante descartado. As amostras foram secadas invertendo-se os microtubos em papel absorvente.

Para a extração do DNA, a cada microtubo foi adicionado 20 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 480 µL de solução constituída por 2,5 mL de Tris HCl 1M pH 8,0; 500 µL EDTA 0,5M pH 8,0; 250 µL de Tween 20 e 46,75 mL de água deionizada. As amostras foram incubadas por 18 horas a 37°C. Foram realizadas duas extrações com 500 µL de fenolclorofórmio. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e centrifugados por dois minutos a 13.000 xg a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e nova extração (v/v) com fenolclorofórmio foi realizada. Adicionou-se 40 µL de acetato de sódio 3M e 1,0 mL de etanol absoluto gelado, misturando-se delicadamente. As amostras foram mantidas por 24 horas, a -20°C, para precipitação do DNA. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 13.000 xg a 4°C e o sobrenadante descartado. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente para secagem do material. Depois de

secas, as amostras foram ressuspensas em 50 μ L de TE 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM pH 8,0) e estocadas a -20°C até sua utilização.

3.3 Quantificação de DNA

Após a extração, todas as amostras de DNA foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro Nano Drop 1000 Overview (Thermo Fisher Scientific, EUA) no comprimento de onda de 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 μ g/mL). A qualidade de DNA ideal estabelecido foi de 1,75 entre as leituras em 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1X concentrado (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0) contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 μ g/mL. Foi utilizado 1,0 μ L de cada amostra com 1,0 μ L de *stop mix* (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 30% de glicerol) e \emptyset X 174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen, EUA) como padrão de tamanho molecular. O gel foi posteriormente visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta para verificar a integridade do DNA.

3.4 Amplificação por PCR

As amostras de DNA obtidas de tecido a fresco ou de material parafinado foram amplificados por meio de PCR, utilizando termociclador VERETI (Applied Biosystems, EUA) e Mastercycler Gradiente (Eppendorf, Alemanha). Utilizando os seguintes *primers*: 5' TGC TTG CTC TGA TAG GAA AAT G 3' e 5' CCA CAA AAT GGA TCC AGA CA 3'.

O volume final de reação foi de 25 μ L contendo 100 ng de DNA genômico de cada paciente, 10 pmol de cada iniciador, 50 μ M de dNTP, tampão específico da enzima, 0,01 mM de MgCl₂ e 0,25 U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation, EUA). Para a amplificação foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 40 segundos,

temperatura de *annealing* por 40 segundos e 72°C por 40 segundos. Ao final, uma extensão a 72°C por sete minutos.

Os produtos da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X concentrado (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0), contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL. Para a análise no gel de agarose foram utilizados 2,5 µL de cada amostra e utilizou-se ØX174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen, Carlsbad) ou 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad) como padrão de tamanho molecular. Os produtos de PCR originam um fragmento de 175 pb.

3.5 Sequenciamento automático

As amostras foram sequenciadas pelo aparelho ABI Prism 3130 xl (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando os mesmos *primers*, conforme o fabricante.

3.6 Reação de sequenciamento

Para a purificação do produto de PCR colocou-se 5 µL de cada amostra e 2 µL da enzima ExoSAP-IT. Essa reação foi colocada em um termociclador VERETI (Applied Biosystems, EUA), por 15 minutos a 37°C, seguido por 15 minutos a 80°C.

Nas amostras purificadas, foram adicionados 1,5 µL do tampão *Save Money*, 1 µL de reagente *Big Dye* e 0,5 pmol dos *primers* anteriormente citados. A reação foi colocada em termociclador VERETI (Applied Biosystems, EUA) por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por cinco segundos, 60°C por quatro minutos.

Posteriormente, a reação foi precipitada, adicionando-se 25 μL de álcool etílico absoluto, 1 μL de acetato de sódio 3 M e 1 μL de EDTA 125 mM. A reação foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. A amostra foi centrifugada a 2.000 g por 45 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, invertendo o tubo cuidadosamente sobre um papel absorvente. Para a precipitação da amostra, acrescentou-se 35 μL de álcool etílico a 70% e centrifugou-se a 1.650 g por 15 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. As amostras foram ressuspendidas em 10 μL de formamida e sequenciadas diretamente.

3.7 Análise do sequenciamento

A análise dos resultados foi feita utilizando o programa Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências obtidas foram comparadas com a sequência do exon 15 do gene BRAF disponível em banco de dados na Internet. Neste estudo utilizou-se como fonte o site Ensemble Genome Browser (www.ensembl.org/index.html).

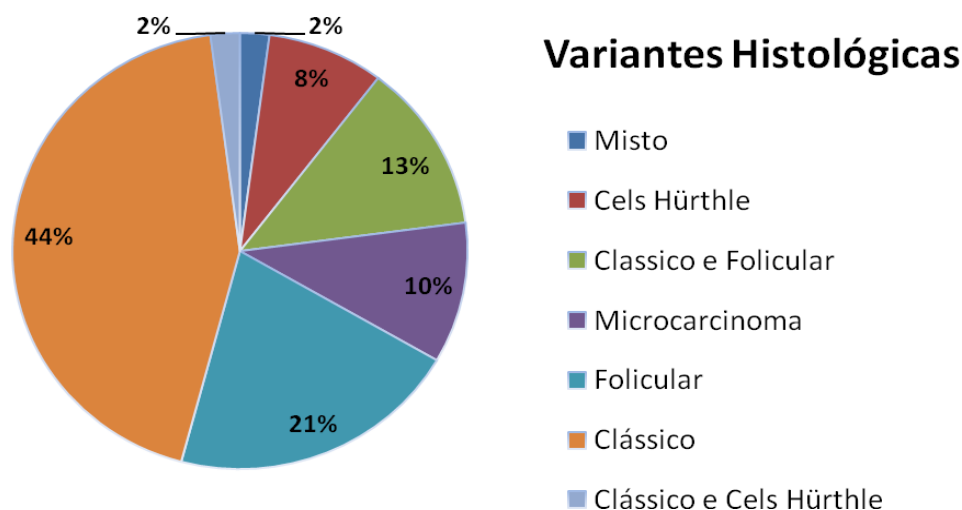
4 Resultados

Dos 54 pacientes seleccionados, 51 foram analisados. O grupo era composto por 41 pacientes do sexo feminino (80,4%) e 10 pacientes do sexo masculino (19,6%). A média das idades foi de 43,6 anos com desvio padrão de 15,8 e a mediana foi de 45 anos, sendo que a idade variou entre 13 e 75 anos.

A realização do protocolo e do esvaziamento demonstrou-se factível e com índices de morbidade semelhantes aos da literatura, obteve-se uma secção de nervo laríngeo recorrente por invasão macroscópica por neoplasia, disфонia transitória em 3,9% dos casos e em 1,9% definitiva. Em relação ao hipoparatiroidismo obteve-se 31,4% de hipoparatiroidismos transitórios e 11,7% de definitivos, apesar de ter sido utilizado o reimplante de paratireoides com liberalidade.

Em relação às variantes histológicas encontradas, tem-se 30 carcinomas papilíferos clássicos, 15 carcinomas papilíferos variante folicular e cinco carcinomas papilíferos variante de células de Hürthle, um carcinoma papilífero misto (com áreas de carcinoma clássico e áreas de variante folicular) e seis casos classificados apenas como microcarcinomas papilíferos. O tamanho das neoplasias variou entre 4 mm e 90 mm, com média de 18,4 mm (desvio padrão de 16,4) e mediana em 14 mm.

Gráfico 2 – Distribuição das variantes histológicas

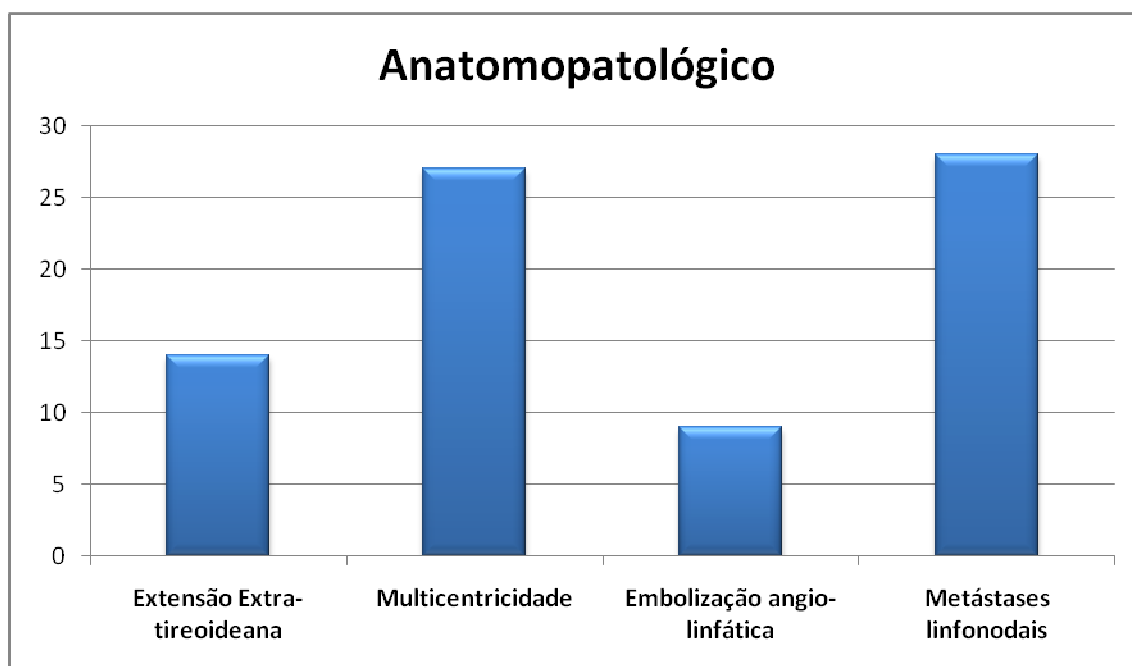


Dentre os 51 pacientes, seis possuíam o diagnóstico histológico de metástase linfonodal em cadeia lateral confirmado por PAAF, portanto, foram submetidos à tireoidectomia total, ao esvaziamento do compartimento central e ao esvaziamento do compartimento lateral acometido. Um desses pacientes possuía o diagnóstico de SIDA. Os outros 45 pacientes não tinham evidências de metástases no pré-operatório e foram submetidos apenas à tireoidectomia total e esvaziamento eletivo do compartimento central. O número de linfonodos dissecados variou entre 5 e 74. A média de linfonodos dissecados no compartimento central foi de 13. A média de linfonodos dissecados quando realizado o esvaziamento do compartimento central e pelo menos um dos compartimentos laterais foi de 40 linfonodos. Teve-se dois casos nos quais foram feitos os esvaziamentos de ambos os compartimentos laterais.

No exame histológico encontraram-se 14 casos (27,5%) que possuíam extensão extratireoidiana, 27 casos (52,9%) com multicentricidade, nove casos (17,6%) com embolização angiolinfática e 28

casos (54,9%) com metástases linfonodais (Gráfico 3). 22 casos (43%) apresentaram metástases no exame de anatomopatológico sem ter evidências no pré-operatório das mesmas.

Gráfico 3 – Fatores de pior prognóstico avaliados no anatomopatológico



4.1 Pesquisa da mutação T1799A (V600E) e fatores histopatológicos e estágio

A mutação T1799A (V600E) foi encontrada em 15 casos (29,4%). Outras mutações localizadas no exon 15 do gene BRAF não foram encontradas em nossas amostras. Dos 15 casos com a mutação, 12 possuíam pelo menos um foco de carcinoma papilífero clássico. Em apenas um caso foi encontrada a mutação em variante folicular do carcinoma papilífero.

Dos pacientes que apresentaram a mutação, 13 eram do sexo feminino. Foi realizado o teste exato de Fisher, a fim de avaliar a associação entre

sexo e a presença da mutação T1799A (V600E). O resultado obtido foi $p = 0,703$ com poder do teste de 96,67% (Tabela 1).

Tabela 1 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e o sexo feminino versus sexo masculino e respectivas porcentagens

		T1799A (V600E) ausente	T1799A (V600E) presente	Total
Sexo	Feminino	28 77,80%	13 86,70%	41 80,40%
	Masculino	8 22,20%	2 13,30%	10 19,60%
Total		36 100%	15 100%	51 100.0%

Foram avaliadas as associações entre a presença da mutação T1799A (V600E) e a idade dos pacientes e o tamanho da neoplasia. A idade apresenta distribuição normal, enquanto que o tamanho não apresenta distribuição normal. Para tanto utilizou-se o Teste t de Student para idade e o Teste de Mann-Whitney para tamanho. Os resultados obtidos foram, respectivamente, $p = 0,524$ e $p = 0,467$ (poder respectivo dos testes: 58,97% e 70,10%), ou seja, não houve correlação (Tabela 2).

Tabela 2 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a idade dos pacientes e o tamanho das neoplasias em milímetros (mm)

Variável	BRAF	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percent 25	Percentil 50 (Mediana)	Percent 75	Signif (p)
Idade	sim	15	45,80	14,52	13,00	71,00	33,00	49,00	54,00	0,524
	não	36	42,67	16,40	17,00	75,00	27,75	43,50	53,25	
	Total	51	43,59	15,79	13,00	75,00	30,00	45,00	54,00	
Tamanho	sim	15	16,27	7,83	4,00	30,00	10,00	15,00	25,00	0,467
	não	36	19,33	18,85	5,00	90,00	8,00	12,00	23,75	
	Total	51	18,43	16,37	4,00	90,00	8,00	14,00	25,00	

Com relação à extensão extratireoidiana, multicentricidade e embolização angiolinfática foram encontrados, respectivamente, os

seguintes dados: $p = 0,301$ (Tabela 3), $p = 1$ (Tabela 4) e $p = 0,709$ (Tabela 5), ou seja, novamente não foram encontradas associações entre a presença da mutação e essas variáveis. Com relação às metástases linfonodais, encontrou-se $p = 1$ (Tabela 6). Em todos os casos foi utilizado o Teste Exato de Fisher (respectivos poderes dos testes: 86,68%; 99,98%; 96,75% e 99,98%).

Tabela 3 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de extensão extratireoidiana e respectivas porcentagens

		T1799A (V600E)		
		ausente	presente	total
Extensão Extra-tireoidiana	não	28 77,80%	9 60,00%	37 72,50%
	sim	8 22,20%	6 40,00%	14 27,50%
	total	27 100%	14 100%	51 100.0%

Tabela 4 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de multicentricidade e respectivas porcentagens

		T1799A(V600E)		
		ausente	presente	total
Multicentricidade	não	17 47,20%	7 46,70%	24 47,10%
	sim	19 52,80%	8 53,30%	27 52,90%
	total	36 100%	15 100%	51 100.0%

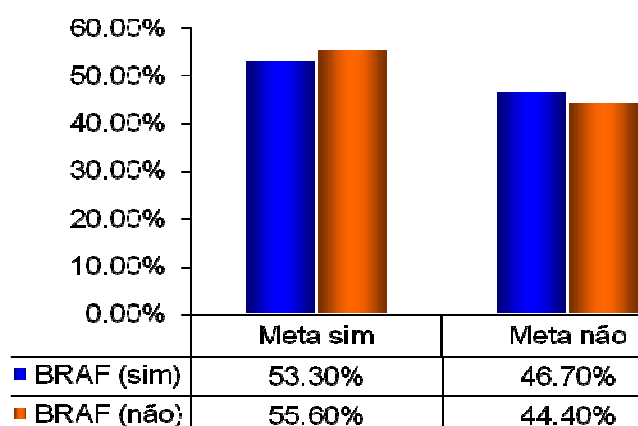
Tabela 5 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e embolização angiolinfática e respectivas porcentagens

		T1799A (V600E)		
		ausente	presente	total
Embolização Angio-linfática	não	29 80,60%	13 86,70%	42 82,40%
	sim	7 19,40%	2 13,30%	9 17,60%
total		36 100%	15 100%	51 100.0%

Tabela 6 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de metástases linfonodais e respectivas porcentagens

		T1799A (V600E)		
		ausente	presente	total
Metástase linfonodal	não	16 44,40%	7 46,70%	23 45,10%
	sim	20 55,60%	8 53,30%	28 54,90%
total		36 100%	15 100%	51 100.0%

Gráfico 4 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e a presença de metástases linfonodais



A fim de avaliar a relação entre a presença da mutação T1799A (V600E) e o estágio, foi aplicado o Teste da Razão de Verossimilhança, conforme a Tabela 7. Foi encontrado $p = 0,229$.

Tabela 7 – Associação entre pacientes que apresentavam a mutação T1799A (V600E) e estágio conforme classificação TNM da AJCC e respectivas porcentagens

		T1799A (V600E)		
		ausente	presente	total
Estádio	I	28 77,80%	8 53,30%	36 70,60%
	III	6 16,70%	5 33,30%	11 21,60%
	IVa	2 5,60%	2 13,30%	4 7,80%
	total	27 100%	14 100%	51 100.0%

Como não foram encontradas variáveis estatisticamente elegíveis para realizar a regressão logística, a mesma não foi realizada nesse caso.

A única variável candidata ao modelo de regressão logística foi a variável estágio. Como a comparação entre a presença de mutação T1799A (V600E) e estágio resultou em diferença estatisticamente não significativa ($p = 0,229$), não foi possível contruir um modelo para regressão logística.

4.2 Resultados entre a análise da presença de metástases linfonodais nos esvaziamentos eletivos e terapêuticos e fatores histopatológicos e estágio

Avaliou-se também a associação entre a presença de metástases linfonodais com os mesmos fatores analisados anteriormente, tanto clínicos quanto histopatológicos, que indicariam pior prognóstico. Os resultados obtidos foram os seguintes: o sexo não apresentou associação com a

presença de metástases ($p = 0,480$); a idade apresentou uma tendência a ter associação com a presença de metástases ($p = 0,070$); e o tamanho não apresentou associação com metástases ($p = 0,141$).

Tabela 8 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e idade do paciente em anos e tamanho das neoplasias em mm

Variável	Metástase	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percent 25	Percentil 50 (Mediana)	Percent 75	Signif(p)
Idade	sim	28	39,96	14,50	13,00	68,00	27,00	43,00	51,00	0,070
	não	23	48,00	16,48	18,00	75,00	34,00	49,00	56,00	
	Total	51	43,59	15,79	13,00	75,00	30,00	45,00	54,00	
Tamanho	sim	28	19,64	14,45	4,00	55,00	10,00	15,00	27,25	0,141
	não	23	16,96	18,66	5,00	90,00	7,00	12,00	15,00	
	Total	51	18,43	16,37	4,00	90,00	8,00	14,00	25,00	

Em relação aos fatores histopatológicos, obteve-se, respectivamente, para extensão extratireoidiana, multicentricidade e embolização angiolinfática, $p = 0,210$; $p = 0,005$ (Tabela 10) e $p = 0,003$ (Tabela 11).

Tabela 9 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e a presença de multicentricidade e respectivas porcentagens

		Metástase linfonodal		
		ausente	presente	total
Multicentricidade	não	16 69,60%	8 28,60%	24 47,10%
	sim	7 30,40%	20 71,40%	27 52,90%
total		23	28	51

Gráfico 5 – Análise entre a presença de metástases linfonodais e multicentricidade tumoral

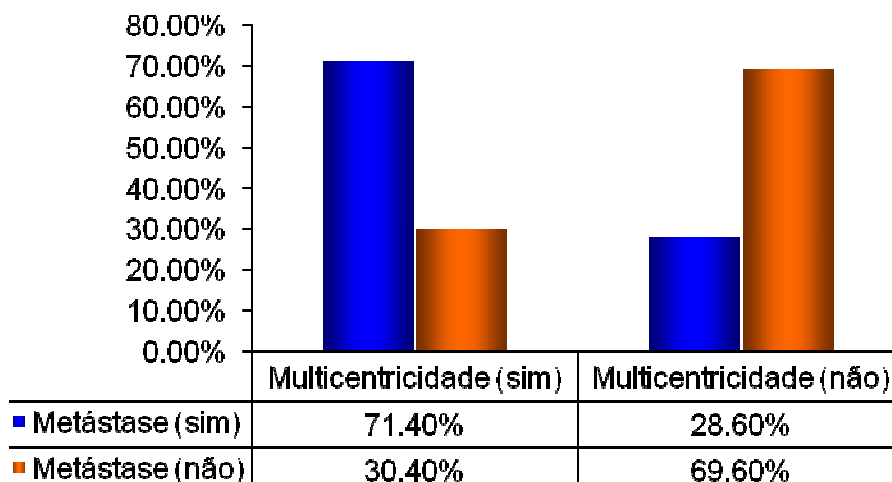
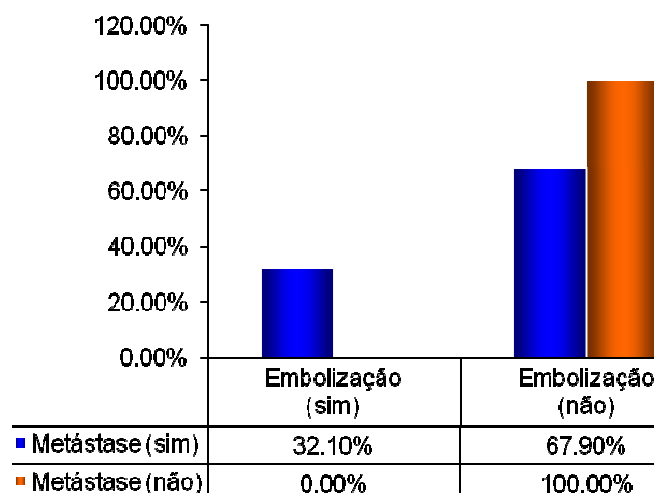


Tabela 10 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e a presença de embolização angiolinfática e respectivas percentagens

		Metástase linfonodal		
		ausente	presente	total
Embolização Angio-linfática	não	23	19	42
		100%	67,90%	82,40%
	sim	0	9	9
		0%	32,10%	17,60%
	total	23	28	51
		100%	100%	100.0%

Gráfico 6 – Análise entre a presença de metástases linfonodais e embolização angiolímfática

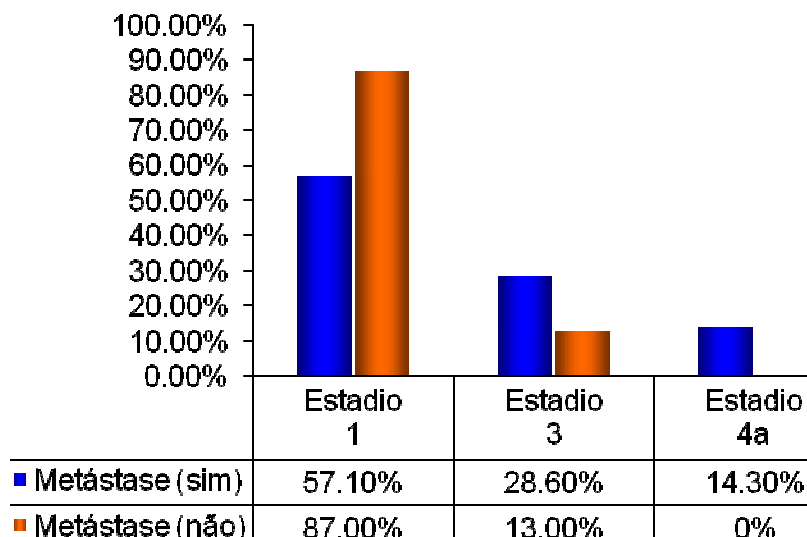


Foi avaliada também a relação entre a presença de metástases e o estágio. O valor de p obtido foi $p = 0,020$ e, portanto, estatisticamente significativo.

Tabela 11 – Associação entre a presença de metástases linfonodais e estágio conforme classificação TNM da AJCC e respectivas porcentagens

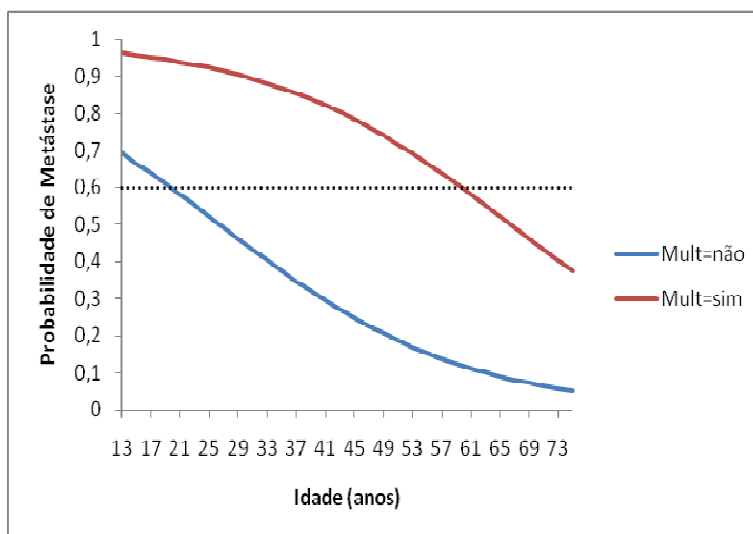
		metástase		
		ausente	presente	total
Estádio	I	20 87,00%	16 57,10%	36 70,60%
	III	3 13,00%	8 28,60%	11 21,60%
	IVa	0 0,00%	4 14,30%	4 7,80%
total		23 100%	28 100%	51 100.0%

Gráfico 7 – Análise entre a presença de metástases linfonodais e estágio conforme classificação TNM da AJCC



A partir dos resultados da análise univariada foram selecionadas as variáveis para a regressão logística: idade e multicentricidade. Embolização angio-linfática acabou sendo excluída pois nenhum dos casos sem metástase apresentava a embolização e portanto, não haveria como prever o comportamento dessa variável. O resultado da regressão logística foi o de um Odds Ratio de 10,97 para multicentricidade e de 0,94 para idade (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Regressão logística e construção de modelo preditor de metástases



5 Discussão

Uma vez estabelecido que a propensão do CPT apresenta metástases para o compartimento central muito alta, o padrão de disseminação linfonodal, o comportamento dessas metástases em relação ao tratamento cirúrgico e ao tratamento com iodo, torna-se pertinente. Reforçar conceitos de esvaziamento eletivo e definições anatômicas também têm sua importância, haja vista que existem várias classificações para os níveis cervicais a exemplo do trabalho de Noguchi (11-12) já citado. Deve-se considerar também as limitações dos métodos de imagem para avaliar linfonodos do compartimento central (13). Choi (14) encontra sensibilidade no US pré-operatório em torno de 42% para linfonodos do compartimento central.

É aceito que a presença de metástases linfonodais está correlacionada com persistência e recidiva do PTC (61). Durante muito tempo acreditou-se que, apesar da chance de recidiva local ser maior, a presença de linfonodos metastáticos não alterava a mortalidade desses pacientes. O estudo publicado por Lundgren (38), em 2006, com uma casuística com 5554 pacientes, desafiou esse conceito. Outro estudo do Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER), baseado em coleta de dados de 9904 pacientes, conclui que metástases linfonodais são um fator de risco independente para mortalidade em pacientes com idade acima de 45 anos. Não existem estudos prospectivos que avaliem o impacto do esvaziamento do compartimento central em relação às recidivas, e a morte relacionada com a doença (62-63).

O esvaziamento do compartimento central também pode ser realizado com segurança, quando feito por cirurgiões experientes. Henry (64) relata em 50 pacientes submetidos ao esvaziamento eletivo, não ter tido nenhum caso de paralisia de nervo laríngeo recorrente definitiva, com apenas 6% de

paralisia transitória e nenhum caso de hipoparatireoidismo definitivo e 8% de hipoparatireoidismo transitório.

Existem, ainda, evidências de que a realização do esvaziamento do compartimento central pode melhorar o estadiamento em torno de 30% dos pacientes com tumores com menos de 2,0 cm, os quais, inicialmente, não apresentavam metástases linfonodais e que, por outras razões, não teriam indicação do tratamento com RIT, mas passam a ter indicação por conta das metástases identificadas apenas após a dissecação linfonodal (65).

Outro aspecto a ser ressaltado é a possível redução das dosagens de tireoglobulina no pós-operatório dos pacientes submetidos ao esvaziamento eletivo em relação aos pacientes submetidos apenas à tireoidectomia total. Sywak (66) encontrou em 56 pacientes submetidos ao esvaziamento, tireoglobulina de 0,4 µg/L, enquanto em 391 casos submetidos apenas à tireoidectomia, tireoglobulina de 9,3 µg/L.

Devemos, ainda, lembrar que a reoperação do compartimento central é muito mais mórbida do que uma primeira abordagem, necessitando maior experiência, tempo e recursos por parte da equipe cirúrgica.

Em contrapartida, é sabido que o comportamento de metástases macroscópicas é diferente do comportamento de micrometástases, e a maior parte (57% na casuística de Noguchi) das metástases encontradas no esvaziamento eletivo tem menos de 3 mm. Outra questão importante é o aumento da morbidade do procedimento proporcionalmente à sua extensão, ou seja, a tireoidectomia total tem menor morbidade do que a tireoidectomia acrescida do esvaziamento central unilateral, a qual por sua vez tem menor morbidade do que a tireoidectomia acrescida do esvaziamento central bilateral. Shen (67) demonstra um aumento significativo do hipoparatireoidismo transitório (41,8% vs 23,6%), mesmo em um serviço experiente. Portanto, sem uma justificativa coletiva, é imprudente tentar padronizar uma conduta para todo um grupo de pacientes, nos quais apenas

uma pequena parcela pode se beneficiar do tratamento mais agressivo, enquanto muitos podem sofrer prejuízo do tratamento mais mórbido.

Pensando desse modo, existe um grande esforço em selecionar essa parcela de pacientes que se beneficiariam do tratamento mais completo e agressivo. A mutação T1799A (V600E) do gene BRAF surgiu como uma grande promessa em diversos estudos retrospectivos. Nas diretrizes de 2009 da ATA, foi incluída a recomendação 8, que sugere a realização de marcadores moleculares para ajudar a diagnosticar neoplasias malignas em casos com PAAF indeterminada (7-68). Como o papel do BRAF no diagnóstico do CPT está bem estabelecido, é natural que na medida em que a pesquisa da mutação se tornar mais acessível acabe-se por realizá-la com maior frequência. Portanto, o próximo passo é determinar o papel da mutação também no prognóstico do paciente. Na ausência de estudos prospectivos, devemos ter como premissas os estudos retrospectivos, que em sua maioria sugerem a associação entre a mutação e a presença de metástases linfonodais.

A pesquisa da mutação também se mostrou factível ao ser realizada na parafina. O método escolhido foi o sequenciamento, pois se poderia avaliar a presença de outras mutações do gene BRAF, que não a T1799A (69). A única mutação encontrada nos casos em estudo foi a T1799A. Observa-se também uma diferença da prevalência da mutação (29,4%) em relação à encontrada por Cerutti (48%). A associação da mutação com a variante clássica também foi observada neste presente estudo como é descrito na literatura, sendo que dos 15 casos que apresentaram a mutação, 12 (80%) foram considerados variantes clássicas.

Ao avaliar os exames anatomopatológicos, deve-se ressaltar a presença de 28 casos (54,9%) nos quais foram encontrados metástases linfonodais. Desses 28 casos, 22 não possuíam o diagnóstico pré-operatório clínico ou ultrassonográfico de metástases linfonodais. Esses achados também são compatíveis com a literatura. Outro dado de extrema importância é a

prevalência encontrada de múltiplos focos de carcinoma nas peças. Foram encontrados 27 casos (52,9%) de neoplasias multifocais. Isso provavelmente se deve ao rigor em que as peças são avaliadas no Serviço de Patologia do ICESP. Focos microscópicos são encontrados com a metodologia e empenho da equipe de patologistas.

Ao avaliar a presença da mutação T1799A (V600E) do gene BRAF e as variáveis clínicas (sexo, idade e tamanho da neoplasia) e com variáveis anatomopatológicas (extensão extratireoidiana, multicentricidade, embolização angiolinfática e metástases linfonodais) não foi encontrada relevância estatística para nenhuma delas. A avaliação entre a presença da mutação e o estágio TNM também não se demonstrou estatisticamente significativa. Novamente, ressalta-se que o trabalho de Ito (44), cuja metodologia é semelhante a empregada neste estudo, também apresenta resultados parecidos, porém, com uma casuística maior (631 casos).

Deve-se ressaltar o número de casos avaliados (51 pacientes) como um número que não permite a conclusão de que não existam as associações estudadas. Outro aspecto importante do estudo foi a avaliação de pacientes com metástases clinicamente não diagnosticáveis no pré-operatório e que foram incluídas neste modelo de estudo. Desses 22 pacientes, 14 (63,6%) possuíam idade menor do que 45 anos. Foram encontrados 6 casos com a mutação nesse grupo de pacientes, ou seja, frequência de 27,2%. Deve-se mencionar que a mutação T1799A (V600E) é menos frequente em pacientes com menos de 21 anos (70), apenas dois pacientes estudados tinham idade inferior a essa. Avaliando o grupo com metástases clinicamente detectáveis, teve-se seis casos no período estudado. Dos seis casos, dois apresentaram a mutação, ou seja, 33,3% de frequência. É possível questionar se metástases com comportamento mais agressivo teriam uma maior frequência da mutação T1799A (V600E), porém, o intuito do estudo não foi o de comparar essas duas populações.

Ao avaliar os fatores associados à presença de metástases linfonodais, obteve-se alguns dados importantes. Na análise univariada, a avaliação da idade dos pacientes que apresentaram metástases, apesar de não ter havido significância estatística ($p = 0,070$), evidenciou que a média da idade dos pacientes com metástase foi de aproximadamente 40 anos, enquanto a dos pacientes sem metástase foi de 48 anos. Em relação aos fatores histopatológicos, houve associação da presença de metástases tanto com multicentricidade tumoral quanto com embolização angioliifática.

A associação entre metástases e multicentricidade talvez não seja devidamente valorizada na literatura, a não ser em alguns poucos estudos (71-72). No estudo realizado, a metodologia que possibilitou esses resultados, demanda mais tempo, além de recursos humanos e financeiros.

Em relação à recomendação da ATA, que diz respeito aos esvaziamentos eletivos do compartimento central, considerar apenas a classificação TNM ao optar por um esvaziamento eletivo, talvez não seja o suficiente. Mais uma vez fica claro que o TNM não foi planejado para prever recidiva, mas, sim, mortalidade.

Na regressão logística a idade também foi um fator independente relacionado à presença de metástases linfonodais, sendo que, pacientes mais jovens apresentam maiores chances de terem metástases.

A modo de uma consideração final acredita-se que a partir dos dados obtidos, é prudente valorizar a multicentricidade. Quando se obtém US e PAAF de boa qualidade pode-se ter a informação da multicentricidade em alguns casos no pré-operatório. O mesmo vale para o exame de congelação e, portanto, um exame que muitas vezes é desvalorizado ou utilizado apenas para confirmação diagnóstica, pode ser utilizado como um dado a mais na decisão intraoperatória da extensão da cirurgia.

6 Conclusão

- 1) A frequência da mutação BRAF encontrada para a população estudada foi de 29,4%.
- 2) Não houve associação entre a mutação T1799A (V600E) e a presença de metástases linfonodais ou qualquer outro fator clínico ou histopatológico relacionado ao mau prognóstico.
- 3) As variáveis associadas à presença de metástases linfonodais foram: a idade, sendo que pacientes mais jovens apresentaram metástases mais frequentemente e a multicentricidade na regressão logística. Na análise univariada a embolização angiolinfática também foi associada à presença de metástases linfonodais.

Anexos

Anexo A – Tabela com identificação dos pacientes (registro geral do Hospital das Clínicas) e variáveis analisadas: idade, sexo, tamanho da neoplasia, mutação V600E, subtipo histológico, extensão extra-tireoidiana, multicentricidade, embolização angiolinfática, metástases linfonodais e estágio.

	RGHC	Idade	Sexo	Tam.	V600E	Variante	Ext.	Mult.	Inv.	Met.	Estádio
1	60001122E	46	M	15	n	Folicular	n	n	n	n	1
2	13835303E	49	F	15	s	Clássico	s	n	n	n	3
3	2480721E	75	F	6	n	Folicular	n	n	n	n	1
4	60001303B	43	F	6	n	Microcarcinoma	n	s	n	s	1
5	60001202G	45	F	5	n	Microcarcinoma	n	n	n	n	1
6	60001304A	27	F	12	n	Clássico	n	n	n	s	1
7	60001214B	53	F	7	s	Microcarcinoma	n	s	n	n	1
8	13873605J	45	F	28	n	Folicular	s	s	s	s	3
9	13497062D	56	M	5	n	Clássico	n	n	n	n	1
10	13876947B	56	F	8	s	Misto	n	n	n	n	1
11	13773398J	33	F	12	n	Microcarcinoma	n	n	n	n	1
12	13882359B	46	F	15	s	Clássico e Folicular	n	s	n	s	4a
13	2046878A	71	F	13	s	Cels Hürthle Clássico e Cels Hürthle	s	n	n	n	3
14	60001514	54	M	30	s	Hürthle	n	s	n	s	4a
15	13861418	44	F	90	n	Folicular	n	n	n	n	1
16	2425903	23	M	7	n	Clássico	n	n	n	s	1
17	13893085	24	F	55	n	Clássico	s	s	s	s	1
18	2272240	41	M	14	n	Clássico e Folicular	n	s	n	s	1
19	13893010	17	F	10	n	Microcarcinoma	n	n	s	s	1
20	13891855	51	F	15	n	Clássico e Folicular	s	n	n	s	3
21	13893872	34	F	6	n	Clássico	n	s	n	n	1
22	13896587	44	F	14	s	Clássico e Folicular	n	n	n	n	1
23	2743598	30	F	4	s	Clássico e Folicular	n	s	n	s	1
24	60002689J	51	F	10	n	Clássico e Folicular	s	s	n	s	3
25	88501883B	73	F	15	n	Folicular	n	s	n	n	1
26	13888061	33	F	10	s	Folicular	n	s	n	s	1

continua

continuação

27	13902773	13	F	25	s	Clássico	s	n	n	s	1
28	13902836	52	F	15	s	Clássico	n	n	n	n	1
29	60003256	49	F	25	s	Clássico	s	s	n	n	3
30	77099491	18	F	10	n	Clássico	n	n	n	n	1
31	3044074	68	F	55	n	Clássico	s	s	s	s	4a
32	13910201	58	F	28	s	Clássico	s	s	s	s	3
33	13906149	58	F	40	n	Cels Hürthle	n	s	n	s	3
34	3095008	50	M	50	n	Folicular	s	s	s	s	4a
35	13901922	50	F	12	n	Folicular	n	s	n	s	3
36	13912672	54	F	8	n	Clássico	n	n	n	n	1
37	13911686	43	F	9	n	Clássico	n	n	n	s	1
38	55503543	27	F	15	s	Clássico	s	s	s	s	1
39	13880716	59	F	10	n	Cels Hürthle	n	s	n	n	1
40	13925513	17	M	15	n	Folicular	n	s	s	s	1
41	13920174	27	F	10	n	Clássico	n	s	s	s	1
42	13850681	23	M	25	n	Clássico	n	n	n	n	1
43	5020946	30	M	20	n	Clássico	n	n	n	s	1
44	13915477	43	F	5	n	Microcarcinoma	n	s	n	n	1
45	13886405	46	F	12	n	Cels Hürthle	n	s	n	s	1
46	13931873	75	F	8	n	Folicular	n	s	n	n	1
47	13734710	39	F	15	n	Clássico	s	s	n	s	1
48	13936202	21	F	25	n	Clássico	n	n	n	n	1
49	77106386	52	M	20	s	Clássico	n	n	n	s	3
50	13876526	31	F	48	n	Clássico	s	n	n	n	1
51	2242974	56	F	8	n	Clássico	n	s	n	s	3

Anexo B – Resumo do TNM sétima edição sobre câncer da tireoide

Papilífero ou Folicular			
Menos do que 45 anos			
Estádio I	Qualquer T	Qualquer N	M0
Estádio II	Qualquer T	Qualquer N	M1
Papilífero or Folicular 45 anos ou mais e Medular			
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
	T1. T2. T3	N1a	M0
Estádio IVA	T1. T2. T3	N1b	M0
	T4a	N0. N1	M0
Estádio IVB	T4b	Qualquer N	M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1
Anaplásico/ Indiferenciado (todos os casos são Estádio IV)			
Estádio IVA	T4a	Qualquer N	M0
Estádio IVB	T4b	Qualquer N	M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1
Glândula Tireoide			
Papilífero, folicular e carcinoma medular			
T1	T1a 1 cm ou menos T1b >1cm e ≤2 cm intratireoidiano		
T2	>2 to 4 cm intratireoidiano		
T3	>4 cm ou extensão mínima		
T4a	Subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago, nervo laríngeo		
T4b	Fáscia Pré-vertebral, vasos mediastinais, artéria carótida		
Anaplásico/ carcinoma indiferenciado			
T4a	Tumor limitado à tireoide		
T4b	Tumor além da capsula tireoidiana		
Todos os tipos			
N1a	Nível VI		
N1b	Outros regionais		

Anexo C – Aprovação da Comissão de Ética Hospitalar e termo de consentimento livre

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP**

1 – Essas informações são fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, o qual visa identificar pacientes com tumores na tireoide que tenham a mutação no gene BRAF, correlacionando com a presença de gânglios metastáticos na região cervical.

2 – Durante a remoção da tireoide, o nódulo suspeito será identificado na peça e um fragmento do tumor será retirado para o estudo genético. A tireoide será enviada para o estudo de congelação e sempre que for confirmada a neoplasia maligna nesse exame, será realizada a remoção dos gânglios linfáticos localizados no pescoço, na região entre as carótidas, ou seja, próximos à tireoide. Esse procedimento será realizado pela mesma incisão, sem ser necessário o aumento da incisão para tal.

3 – A remoção do fragmento do tumor será feita durante a cirurgia, com o paciente anestesiado, após a remoção da tireoide. Não haverá riscos adicionais durante a cirurgia, já que a remoção será feita na peça. O fragmento retirado terá em torno de 2 a 3 mm e será armazenado em nitrogênio líquido para a realização do estudo genético.

4 – Não haverá desconforto ao paciente decorrente da retirada do fragmento do tumor. A cirurgia de tireoide com a remoção dos gânglios linfáticos normalmente tem um risco estimado em torno de 1% de lesão de nervo laríngeo recorrente e em torno de 3% de hipocalcemia definitiva.

5 – O principal benefício do estudo é identificar os pacientes sujeitos a terem uma doença de maior agressividade e que se beneficiarão de um tratamento mais agressivo.

6 – Não existe tratamento alternativo a não ser a remoção da tireoide, nos casos de tumores malignos na mesma. Sempre que houver suspeita de gânglios acometidos, eles devem ser retirados. Em torno de 45 a 50% dos pacientes têm gânglios acometidos na região entre as carótidas.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos

profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador, Dra. **Simone Elisa Dutenhfner**, pode ser localizado no ICESP na Av. Dr. Arnaldo, 255 4º andar. Telefone (11)3069-6425. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – telefone (11)3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: (11)3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

09 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DA MUTAÇÃO BRAF T1799A E A PRESENÇA DE METÁSTASES LINFONODAIS NO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREOIDE” Eu discuti com a Dra. **Simone Elisa Dutenhfner** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Prezado Investigador,

Seu registro de pesquisa nº **4310**, projeto CAPPesq nº **0866/09** passou para o status: **APROVADO** na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP.

Atenciosamente,

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq
Diretoria Clínica – HCFMUSP

Referências

1. Davies L, Welch HG. *Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002*. JAMA 2006;295:2164-2167.
2. Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? *Report from the French Thyroid Cancer Committee*. Thyroid 2004;14:1056-1060
3. Mazzaferri EL. An overview of the management of thyroid cancer. In: Mazzaferri EL, Harmer C, Mallick UK, Kendall-Taylor P, eds. *Practical Management of Thyroid Cancer. A Multidisciplinary Approach*. London, England: Springer-Verlag. 2006;1-28.
4. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Horner MJ, Howlander N, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2007.
5. Mazzaferri EL, Jhiang SM. *Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer*. Am J Med 1994;97:418-428.
6. Xing M. *BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications*. Endocr Rev. 2007 Dec;28(7):742-62.
7. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. *Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer*. Thyroid. 2009 Nov;19(11):1167-214.
8. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W. *European Thyroid Cancer Taskforce*. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. Eur J Endocrinol. 2006 Jun;154(6):787-803.
9. Camargo R, Corigliano S, Friguglietti C, Gauna A, Harach R, Munizaga F, Niepomniscze H, Pitoia F, Pretell E, Vaisman M, Ward

- LS, Wohllk N, Tomimori E. *Latin American thyroid society*. Latin American thyroid society recommendations for the management of thyroid nodules. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009 Dec;53(9):1167-75.
10. Mazzaferri EL, Doherty GM, Steward DL. *The pros and cons of prophylactic central compartment lymph node dissection for papillary thyroid carcinoma*. *Thyroid*. 2009 Jul;19(7):683-9. Review.
 11. Noguchi S, Noguchi A, Murakami N. *Papillary carcinoma of the thyroid*. I. Developing pattern of metastasis. *Cancer*. 1970 Nov;26(5):1053-60.
 12. Noguchi S, Noguchi A, Murakami N. *Papillary carcinoma of the thyroid*. II. Value of prophylactic lymph node excision. *Cancer*. 1970 Nov;26(5):1061-4.
 13. Kouvaraki MA, Shapiro SE, Fornage BD, Edeiken-Monro BS, Sherman SI, Vassilopoulou-Sellin R, Lee JE, Evans DB. *Role of preoperative ultrasonography in the surgical management of patients with thyroid cancer*. *Surgery*. 2003 Dec;134(6):946-54; discussion 954-5.
 14. Choi YJ, Yun JS, Kook SH, Jung EC, Park YL. *Clinical and imaging assessment of cervical lymph node metastasis in papillary thyroid carcinomas*. *World J Surg*. 2010 Jul;34(7):1494-9.
 15. O'Neill CJ, Bullock M, Chou A, Sidhu SB, Delbridge LW, Robinson BG, Gill AJ, Learoyd DL, Clifton-Bligh R, Sywak MS. *BRAF (V600E) mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with thyroid cancer*. *Surgery*. 2010 Dec;148(6):1139-45; discussion 1145-6. PubMed PMID: 21134544.
 16. Sykorova V, Dvorakova S, Ryska A, Vcelak J, Vaclavikova E, Laco J, Kodetova D, Kodet R, Cibula A, Duskova J, Hlobilkova A, Astl J, Vesely D, Betka J, Hoch J, Smutny S, Cap J, Vlcek P, Novak Z, Bendlova B. *BRAF V600E mutation in the pathogenesis of a large series of papillary thyroid carcinoma in Czech Republic*. *J Endocrinol Invest*. 2010 May;33(5):318-24. Epub 2009 Dec 4. PubMed PMID:20009493.
 17. Kwak JY, Kim EK, Chung WY, Moon HJ, Kim MJ, Choi JR. *Association of BRAF V600E mutation with poor clinical prognostic factors and US features in Korean patients with papillary thyroid microcarcinoma*. *Radiology*. 2009 Dec;253(3):854-60. Epub 2009 Aug 25. PubMed PMID: 19710001.

18. 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. PubMed PMID: 19152441.
19. Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, Romei C, Miccoli P, Pinchera A, Basolo F. *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. Epub 2008 Aug 5. PubMed PMID: 18682506.
20. Wang Y, Ji M, Wang W, Miao Z, Hou P, Chen X, Xu F, Zhu G, Sun X, Li Y, Condouris S, Liu D, Yan S, Pan J, Xing M. *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. PubMed PMID: 18310286.
21. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F. *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. Epub 2007 Sep 4. PubMed PMID: 17785355.
22. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, Shibru D, Bastian B, Griffin A. *The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer.* Ann Surg. 2007 Sep;246(3):466-70; discussion 470-1. PubMed PMID: 17717450; PubMed Central PMCID: PMC1959359.
23. Rodolico V, Cabibi D, Pizzolanti G, Richiusa P, Gebbia N, Martorana A, Russo A, Amato MC, Galluzzo A, Giordano C. *BRAF V600E mutation and p27 kip1 expression in papillary carcinomas of the thyroid ≤ 1 cm and their paired lymph node metastases.* Cancer. 2007 Sep 15;110(6):1218-26. PubMed PMID: 17685465.
24. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, Lee S, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK. *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. PubMed PMID: 16918957.
25. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD,

- Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. *BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Dec;90(12):6373-9. Epub 2005 Sep 20. PubMed PMID: 16174717.
26. DuBose J, Barnett R, Ragsdale T. *Honest and sensible surgeons: the history of thyroid surgery*. Curr Surg. 2004 Mar-Apr;61(2):213-9.
27. Crile G. III. *On the Technique of Operations upon the Head and Neck*. Ann Surg. 1906 Dec;44(6):842-50.
28. CATTELL RB. *Indications from neck dissection in carcinoma of the thyroid*. J Clin Endocrinol Metab. 1950 Sep;10(9):1099-1107.
29. McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. *Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome*. Mayo Clin Proc. 1986 Dec;61(12):978-96.
30. Hay ID, McConahey WM, Goellner JR. *Managing patients with papillary thyroid carcinoma: insights gained from the Mayo Clinic's experience of treating 2,512 consecutive patients during 1940 through 2000*. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2002;113:241-60.
31. Mazzaferri EL, Young RL. *Papillary thyroid carcinoma: a 10 year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients*. Am J Med. 1981 Mar;70(3):511-8.
32. Herle AJ, Uller RP. *Elevated serum thyroglobulin. A marker of metastases in differentiated thyroid carcinomas*. J Clin Invest. 1975 Aug;56(2):272-7.
33. Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW. *Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1991 Jun;117(6):601-5.
34. Sugino K, Kure Y, Iwasaki H, Ozaki O, Mimura T, Matsumoto A, Ito K. *Metastases to the regional lymph nodes, lymph node recurrence, and distant metastases in nonadvanced papillary thyroid carcinoma*. Surg Today. 1995;25(4):324-8.
35. Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. *Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis*. Head Neck. 1996 Mar-Apr;18(2):127-32.

36. Wada N, Duh QY, Sugino K, Iwasaki H, Kameyama K, Mimura T, Ito K, Takami H, Takanashi Y. *Lymph node metastasis from 259 papillary thyroid microcarcinomas: frequency, pattern of occurrence and recurrence, and optimal strategy for neck dissection.* Ann Surg. 2003 Mar;237(3):399-407.
37. Wada N, Suganuma N, Nakayama H, Masudo K, Rino Y, Masuda M, Imada T. *Microscopic regional lymph node status in papillary thyroid carcinoma with and without lymphadenopathy and its relation to outcomes.* Langenbecks Arch Surg. 2007 Jul;392(4):417-22.
38. Lundgren CI, Hall P, Dickman PW, Zedenius J. *Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: a population-based, nested case-control study.* Cancer. 2006 Feb 1;106(3):524-31.
39. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Sherman SI, Tuttle RM. American Thyroid Association Guidelines Taskforce. *Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer.* Thyroid. 2006 Feb;16(2):109-42.
40. Ito Y, Jikuzono T, Higashiyama T, Asahi S, Tomoda C, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. *Clinical significance of lymph node metastasis of thyroid papillary carcinoma located in one lobe.* World J Surg. 2006 Oct;30(10):1821-8.
41. Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. *The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma.* Cancer. 2005 Jun 1;103(11):2269-73.
42. Orloff LA, Koppersmith RB. *American Thyroid Association's central neck dissection terminology and classification for thyroid cancer consensus statement.* Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Jan;142(1):4-5.
43. American Thyroid Association Surgery Working Group; American Association of Endocrine Surgeons; American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery; American Head and Neck Society. Carty SE, Cooper DS, Doherty GM, Duh QY, Kloos RT, Mandel SJ, Randolph GW, Stack BC Jr, Steward DL, Terris DJ, Thompson GB, Tufano RP, Tuttle RM, Udelsman R. *Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer.* Thyroid. 2009 Nov;19(11):1153-8.
44. Ito Y, Yoshida H, Maruo R, Morita S, Takano T, Hirokawa M, Yabuta T, Fukushima M, Inoue H, Tomoda C, Kihara M, Uruno T, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A. *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 Mar;56(1):89-97.
45. Fagin JA, Mitsiades N. *Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008 Dec;22(6):955-69.
46. Bertelli, Antonio Augusto Tupinambá. *Mutação BRAF em pacientes idosos submetidos à tireoidectomia.* (Dissertação de Mestrado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2010.
47. Araújo, Priscila Pereira Costa de. *Análise da expressão do gene BRAF – implicações diagnósticas e prognósticas para pacientes portadores de carcinoma papilífer da tireoide.* (Dissertação de Mestrado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas; 2009.
48. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. *High frequency of BRAF mutations in nevi.* Nat Genet. 2003 Jan;33(1):19-20.
49. 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.
50. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S. *Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers.* J Clin Endocrinol Metab. 2003 Sep;88(9):4393-7.
51. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. *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.
52. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, Rogounovitch T, Namba H, Abrosimov A, Lushnikov E, Kumagai A, Nakashima M, Meirmanov S, Mine M, Hayashi T, Yamashita S. *The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma.* Int J Oncol. 2004 Dec;25(6):1729-35.

53. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, Sidransky D, Westra WH. *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 Apr 15;10(8):2761-5.
54. Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Máximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhães J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. *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 Jun;446(6):589-95.
55. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, Huang CC, Cheng JT. *Nocorrelation between BRAF V600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan.* Clin Endocrinol (Oxf). 2005 Oct;63(4):461-6.
56. Mesa C Jr, Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, Knauf JA, Weber GF, Fagin JA. *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 Jul 1;66(13):6521-9.
57. Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y, Holt EH, Kiseljak-Vassiliades K, Rhoden KJ, Tolaney S, Condouris S, Tallini G, Westra WH, Umbricht CB, Zeiger MA, Califano JA, Vasko V, Xing M. *Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer.* Int J Cancer. 2006 Nov 15;119(10):2322-9.
58. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, Barbi F, Avenia N, Scipioni A, Verrienti A, Tosi E, Cavaliere A, Gulino A, Filetti S, Russo D. *BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism.* J Clin Endocrinol Metab. 2007 Jul;92(7):2840-3.
59. Yip L, Nikiforova MN, Carty SE, Yim JH, Stang MT, Tublin MJ, Lebeau SO, Hodak SP, Ogilvie JB, Nikiforov YE. *Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation.* Surgery. 2009 Dec;146(6):1215-23.

60. Mazzaferri EL, Doherty GM, Steward DL. *The pros and cons of prophylactic central compartment lymph node dissection for papillary thyroid carcinoma*. *Thyroid*. 2009 Jul;19(7):683-9.
61. Machens A, Hinze R, Thomusch O, Dralle H. *Pattern of nodal metastasis for primary and reoperative thyroid cancer*. *World J Surg*. 2002 Jan;26(1):22-8.
62. Podnos YD, Smith D, Wagman LD, Ellenhorn JD. *The implication of lymph node metastasis on survival in patients with well-differentiated thyroid cancer*. *Am Surg*. 2005 Sep;71(9):731-4.
63. Zaydfudim V, Feurer ID, Griffin MR, Phay JE. *The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma*. *Surgery*. 2008 Dec;144(6):1070-7; discussion 1077-8.
64. Henry JF, Gramatica L, Denizot A, Kvachenyuk A, Puccini M, Defechereux T. *Morbidity of prophylactic lymph node dissection in the central neck area in patients with papillary thyroid carcinoma*. *Langenbecks Arch Surg*. 1998 Apr; 383(2):167-9.
65. Bonnet S, Hartl D, Leboulleux S, Baudin E, Lumbroso JD, Al Ghuzlan A, Chami L, Schlumberger M, Travagli JP. *Prophylactic lymph node dissection for papillary thyroid cancer less than 2 cm: implications for radioiodine treatment*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Apr;94(4):1162-7.
66. Sywak M, Cornford L, Roach P, Stalberg P, Sidhu S, Delbridge L. *Routine ipsilateral level VI lymphadenectomy reduces postoperative thyroglobulin levels in papillary thyroid cancer*. *Surgery*. 2006 Dec;140(6):1000-5; discussion 1005-7.
67. Shen WT, Ogawa L, Ruan D, Suh I, Kebebew E, Duh QY, Clark OH. *Central neck lymph node dissection for papillary thyroid cancer: comparison of complication and recurrence rates in 295 initial dissections and reoperations*. *Arch Surg*. 2010 Mar;145(3):272-5.
68. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN. *Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jun;94(6):2092-8.
69. Chiosea S, Nikiforova M, Zuo H, Ogilvie J, Gandhi M, Seethala RR, Ohori NP, Nikiforov Y. *A novel complex BRAF mutation detected in a solid variant of papillary thyroid carcinoma*. *Endocr Pathol*. 2009 Summer;20(2):122-6.

70. Penko K, Livezey J, Fenton C, Patel A, Nicholson D, Flora M, Oakley K, Tuttle RM, Francis G. *BRAF mutations are uncommon in papillary thyroid cancer of young patients.* *Thyroid.* 2005 Apr;15(4):320-5.
71. Salter KD, Andersen PE, Cohen JI, Schuff KG, Lester L, Shindo ML, Sauer D, Gross ND. *Central nodal metastases in papillary thyroid carcinoma based on tumor histologic type and focality.* *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010 Jul;136(7):692-6.
72. Chow SM, Law SC, Chan JK, Au SK, Yau S, Lau WH. *Papillary microcarcinoma of the thyroid-Prognostic significance of lymph node metastasis and multifocality.* *Cancer.* 2003 Jul 1; 98(1):31-40.