Erika Urbano de Lima

Detecção da mutação T1799A do gene *BRAF* em células de carcinoma papilífero obtidas por punção aspirativa com agulha fina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Suemi Marui

São Paulo

2012

Erika Urbano de Lima

Detecção da mutação T1799A do gene *BRAF* em células de carcinoma papilífero obtidas por punção aspirativa com agulha fina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Suemi Marui

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Erika Urbano de
Detecção da mutação T1799A do gene *BRAF* em células de carcinoma papilífero obtidas por punção aspirativa com agulha fina / Erika Urbano de Lima. -- São Paulo, 2012.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Suemi Marui.

Descritores: 1.Neoplasias da glândula tireoide 2.Ultrassonografia 3.Biópsia por agulha 4.Mutação

USP/FM/DBD-200/12

Dedico este trabalho aos meus pais Zilda Maria e Jose Donizete, obrigado por tudo, e principalmente ao meu avô Decio Urbano, saudades!!!

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver....."

Martin Luther King (1929 - 1968)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, Zilda e Donizete, que me deram toda a estrutura para que me tornasse a pessoa que sou hoje. Não conquistaria nada se não estivessem ao meu lado. Obrigada, por estarem sempre presentes a todos os momentos, me dando carinho, apoio, incentivo, determinação, fé, e principalmente pelo Amor de vocês.

À minha orientadora Dra. Suemi Marui por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho.

À Dra. Regina Barros, pela colaboração.

Ao Dr. Eduardo Tomimori e a Dra. Rosalinda Camargo, pelo apoio.

À Simone e Andrea por sempre estarem dispostas a ajudar, assim como todos os funcionários e técnicos do Departamento de Patologia.

À professora Dra. Edna T. Kimura por ter me cedido alguns materiais essenciais para a realização deste estudo.

À Dra. Ericka Trarbach e Dra. Debora Seguro, pela ajuda e colaboração.

À todos os colegas e funcionários do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM 25 e a Disciplina de Endocrinologia.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que eu não citei nas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, e que tenho certeza, sem a colaboração de cada uma delas não teria conseguido.

À Lulu, por seus conselhos e puxões de orelha nas horas de desespero!!!

À Ester, Viviane, Ile e Paola (“LAS CHICAS”), pela amizade e companherismo, muito obrigada por sempre acreditaram em mim e por me apoiarem.

É a todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida fazendo com que ela seja feita de amizades, carinho e alegrias, agradeço todas de coração.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”.

Marie Curie (1867-1934)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Endocronologia Celular e Molecular - Unidade de Tireoide (LIM 25), Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo n° 2009/03321-7 e 2009/07544-0)

Esta dissertação 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 Júlia de AL Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª. Edição São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos periódicos de acordo com o List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
RESUMO
SUMMARY
INTRODUÇÃO..... 1
Câncer da Tireoide..... 2
Via de sinalização MAPK..... 4
Gene *BRAF*..... 6
Fatores prognósticos para o CPT..... 10
Valores séricos de TSH e nódulos da tireoide..... 14
Associação entre o CPT e tireoidite autoimune..... 15
Ultrassonografia de nódulos tireoidianos..... 16
Punção Aspirativa de nódulos tireoidianos..... 19
Pesquisa de mutação p.V600E do gene *BRAF* em material de PAAF.. 24
Genotipagem por PCR em Tempo Real..... 25
OBJETIVOS..... 28
CASUÍSTICA E METODOLOGIA..... 30
Casuística..... 31
Avaliação Hormonal e Autoimunidade..... 31
Ultrassonografia da tireoide..... 31
Diagnóstico Citológico das PAAFs..... 32
Amostras obtidas de PAAF a fresco de nódulos tireoidianos..... 33
Extração de DNA de amostras obtidas por aspirado de PAAF a fresco..... 33
Comparação entre protocolos de extração de DNA de amostras de PAAF a fresco, lavado da agulha de PAAF e de lâminas citológicas de PAAF de nódulos tireoidianos..... 34

Protocolo 1..... 35
Protocolo 2..... 36
Protocolo 3..... 36
Protocolo 4..... 37
Protocolo 5..... 38
Controles utilizados na genotipagem da mutação p.V600E por PCR em tempo real..... 38
Controle Negativo da mutação..... 38
Controle Positivo Heterozigoto da mutação..... 38
Controle Positivo Homozigoto da mutação..... 39
Extração de DNA de leucócitos periféricos..... 39
Extração de DNA a partir de tecido nodular conservado em parafina..... 40
Extração de DNA da célula NPA..... 41
Quantificação de DNA..... 43
Genotipagem da mutação p.V600E do gene BRAF utilizando PCR em tempo real..... 43
Desenhos dos primers..... 43
PCR em tempo real..... 44
Extração de DNA a partir de tecido nodular obtido em cirurgia..... 46
Extração de DNA a partir de tecido nodular a fresco..... 47
Extração de DNA a partir de tecido nodular conservado em parafina..... 47
Análise da mutação p.V600E em tecido nodular..... 48
Seqüenciamento automático..... 48
Avaliação dos achados histológicos obtidos de material cirúrgico..... 50
Avaliação da acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo posivito (VPP) e valor preditivo negativo dos métodos de diagnóstico utilizados..... 50
Análise estatística..... 52
RESULTADOS..... 53
Avaliação dos achados histológicos..... 54

Avaliação Hormonal..... 58
Ultrassonografia da tireóide..... 60
Diagnóstico citológico das PAAFs..... 64
Padronização da técnica de genotipagem por PCR em tempo real..... 65
Comparação entre protocolos de extração de DNA de amostras de PAAF a fresco, lavado da agulha de PAAF e de lâminas citológicas de PAAF de nódulos tireoidianos 67
Análise da mutação p.V600E..... 76
Comparação entre as metodologias de seqüenciamento automático e genotipagem por PCR em tempo real..... 80
Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo posivito (VPP) e valor preditivo negativo (VPN)..... 82
DISCUSSÃO..... 83
CONCLUSÃO..... 102
REFERENCIAS..... 104

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-TG	anticorpo antitireoglobulina
Anti-TPO	anticorpo antitireoperoxidase
ARAF	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog
ATP	adenosina trifosfato
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CDT	carcinoma diferenciado da tireoide
CF	carcinoma folicular
CFT	carcinoma folicular da tireoide
CPT	carcinoma papilífero da tireoide
CPVC	carcinoma papilífero variante clássica
CPVF	carcinoma papilífero variante folicular
CRAF	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
DAIT	doença autoimune da tireoide
dNTP	trifosfato desoxinucleotídeo
ERK	mitogen-activate quinase
et al.	e outros/colaboradores
FRET	transferência de energia de ressonância por fluorescência
FN	falso negativo

FP	falso positivo
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
HBME-1	hector battifora mesothelial cell
IC 95%	intervalo de confiança de 95%
MAPK	mitogen-ativated kinase
MEK	mitogen-activated quinase quinase
NF1	neurofibromin;
OR	odds ratio
PAAF	punção aspirativa com agulha fina
PAAF-USG	punção aspirativa guiada por ultrassonografia
PCR	reação em cadeia da polimerase
PPARγ	peroxisome proliferator -activeted receptor gama
PAX8	paired box gene 8
RAF	murine sarcoma viral oncogene homolog
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog
RIT	radioterapia
SHC	signaling and transforming protein containing Src homology 2 and 3 domains
SOS 1	son of sevenless 1
SHP-2	Src homology region 2-domain phosphatase 2

TT	tireoidectomia total
TNM	sistema internacional de classificação de tumores malignos
TSH	hormônio tireoestimulante
TT+EC	tireoidectomia total + esvaziamento cervical
USG	ultrassonografia
VP	verdadeiro positivo
VN	verdadeiro negativo
VPP	valor preditivo positivo
VPN	valor preditivo negativo
ΔRN	sinal de fluorescência gerado em cada ciclo da PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Via de sinalização RAS/MAPK: resíduos de tirosina fosforilada de receptores de tirosina-quinase agem como sítios de ligação para moléculas intracelulares que contém um domínio SH-2, com SHC, SHP-2 e GRB2.....5

Figura 2 - Estrutura do gene *BRAF*, indicando as posições dos sítios de fosforilação potencialmente importantes envolvidos na regulação da ativação da via MAPK.....7

Figura 3 - Metodologia TaqMan®: a alteração de interesse é detectada através de duas sondas específicas para cada alelo.....27

Figura 4 - Parte do exon 15 do gene *BRAF,* onde está localizada a mutação p.V600E.....44

Figura 5 - Exemplo de gráfico de discriminação alélica.....45

Figura 6 - Curva da amplificação de amostras submetidas à genotipagem.....46

Figura 7 - Gráfico representando a comparação dos gêneros feminino e masculino dos pacientes com diagnóstico histológico benigno e maligno (Teste Qui-quadrado).....55

Figura 8 - Gráfico representando a comparação da idade dos pacientes com diagnóstico histológico benigno vs maligno (Teste T-Student).....56

Figura 9 - Representação gráfica da mensuração de TSH por fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) dos pacientes que realizaram a PAAF-US.....58

Figura 10 - Representação gráfica da mensuração de TSH por fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) dos pacientes com diagnóstico histológico maligno e benigno que realizaram a PAAF-US.....59

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos amplificados do exon 15 do gene *BRAF*.....66

Figura 12 - Gráfico de discriminação alélica gerado nos testes realizados com os DNAs extraídos de PAAF utilizando o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen).....66

Figura 13 - Curva de amplificação das amostras utilizadas nos testes.....67

Figura 14 - (A) Gráfico da comparação da concentração do DNA extraído das amostras de PAAF a fresco e lâmina citológica de PAAF dos pacientes P1 e P2, utilizando os cinco protocolos testados (Teste Kruskal-Wallis). (B) Gráfico da comparação da concentração do DNA extraído das amostras de PAAF a fresco e lâmina citológica de PAAF dos pacientes P1 e P2, utilizando os protocolos 1 e 5 (Teste Mann-Whitney).....70

Figura 15 - Gráfico da concentração do DNA extraído das amostras de PAAF a fresco, lavado da agulha de PAAF e das lâminas citologicas de PAAF dos 37 pacientes avaliados (Teste Mann-Whitney).....71

Figura 16 - Gráfico da relação da leitura de absorbância 260/280 nm das amostras de DNA obtidas de PAAF a fresco, lavado da agulha e lâmina citológica de 37 pacientes avaliados (Teste Mann-Whitney).....72

Figura 17 - Gráfico dos valores da intensidade de fluorescência (ΔRN) de ambos os alelos das amostras de PAAF a fresco, lavado de agulha de PAAF e lâmina citológica de PAAF com ou sem a mutação p.V600E, através da técnica de genotipagem por PCR em tempo real (Teste Mann-Whitney).....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na classificação TNM para câncer da tireoide.....11

Tabela 2 - Classificação simplificada utilizada no Serviço de Patologia HC-FMUSP para o diagnóstico citológico de nódulos tireoidianos.....21

Tabela 3 - Classificação citológica pelo Sistema de Bethesda.....22

Tabela 4 - Classificação de Bethesda para relatar a citopatologia tireoidiana: risco incluído de malignidade e conduta clínica recomendada.....23

Tabela 5 - Características dos cinco protocolos para extração de DNA.....35

Tabela 6 - Condições da reação de PCR em tempo real.....45

Tabela 7 - Características histológicas dos 122 pacientes do grupo benigno submetidos à cirurgia.....55

Tabela 8 - Características histológicas dos 102 pacientes do grupo maligno submetidos à cirurgia.....57

Tabela 9 - Média, valores mínimos e máximos da dosagem sérica de TSH, TG, anti-TPO e anti-TG dos grupos estudados.....60

Tabela 10 - Dados dos 122 nódulos do grupo benigno avaliados pela USG.....61

Tabela 11 - Dados dos 102 nódulos do grupo maligno avaliados pela USG.....62

Tabela 12 - Descrição das características ultrassonográficas dos nódulos dos grupos benigno e maligno segundo os resultados dos testes de associação.....63

Tabela 13 - Resultado do modelo de regressão logística para verificar as variáveis que influenciam conjuntamente na presença de nódulos malignos.....64

Tabela 14 - Diagnóstico citológico das PAAFs com base no sistema de Bethesda.....65

Tabela 15 - Concentração e qualidade do DNA (razão de 260/280) das amostras de PAAF a fresco, correspondentes as lâminas citológicas de PAAF utilizadas no teste piloto.....69

Tabela 16 - Concentração do DNA (ng/µL) obtido através dos três diferentes tipos de amostras.....71

Tabela 17 - Leitura da absorbância 260/280nm das amostras de DNA obtidos através dos três diferentes tipos de amostras.....72

Tabela 18 - Valores da intensidade de fluorescência (ΔRN) de ambos os alelos das amostras com e sem a mutação p.V600E do gene *BRAF*.....73

Tabela 19 - Comparação do custo e tempo necessário para a extração de DNA de uma amostra, utilizando os protocolos 1 (Fenol/Clorofórmio) e 5 (QIAamp DNA Micro Kit).....74

Tabela 20 - Identificação da mutação p.V600E pela técnica de genotipagem por PCR em tempo real dos pacientes do grupo benigno e maligno, de acordo com o diagnóstico histológico.....76

Tabela 21 - Identificação da mutação p.V600E por genotipagem dos

pacientes do grupo benigno e maligno, de acordo com o diagnóstico citológico.....77

Tabela 22 - Descrição das características clínicas, laboratoriais e da USG dos pacientes com CPT com e sem a mutação p.V600E.....77

Tabela 23 - Características descritas na USG dos pacientes com CPT com relação à ausência e presença da mutação p.V600E.....78

Tabela 24 - Características histológicas dos pacientes com CPT com relação à ausência e presença da mutação p.V600E.....79

Tabela 25 - Descrição da análise da presença de metástase linfonodal, classificação TNM e estádio de acordo com AJCC.....80

Tabela 26 - Custo comparativo das metodologias usadas neste trabalho para análise de uma amostra.....81

Tabela 27 - Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) dos métodos utilizados.....82

Tabela 28 - Síntese dos trabalhos que avaliaram o gene BRAF em material de PAAF.....99

RESUMO

Lima EU. *Detecção da mutação T1799A do gene BRAF em células de carcinoma papilífero obtidas por punção aspirativa com agulha fina* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O câncer da tireoide é a neoplasia endócrina mais comum, sendo responsável por cerca de 1 a 2% das neoplasias malignas da tireoide. Atualmente, a patogênese molecular do carcinoma papilífero da tireoide (CPT) tem sido relacionada à ativação aberrante da via de sinalização MAPK, desencadeada por mutações em diversos oncogenes. Destas, a mutação p.V600E do gene *BRAF* é a mais freqüente, sendo observada em 30%-80% dos casos. Numerosos estudos têm demonstrado que a presença dessa mutação está relacionada a uma maior agressividade do tumor e, conseqüentemente, a um prognóstico menos favorável, tornando-a um marcado importante no CPT. Contudo, poucos métodos utilizados na análise do gene *BRAF* em amostras de punção de nódulos tireoidianos foram satisfatórios em relação ao custo-tempo e sensibilidade do teste. Os objetivos deste estudo foram padronizar a extração de DNA a partir de amostras obtidas de PAAF guiada por ultrassom de nódulos tireoidianos; validar e determinar a eficiência e a relação custo-tempo da técnica de genotipagem por PCR em tempo real na detecção da mutação p.V600E do gene *BRAF* em amostras de PAAF de nódulos tireoidianos; analisar a prevalência da mutação p.V600E em pacientes com CPT; correlacionar à presença da mutação p.V600E com características clínicas e histopatológicas de maior agressividade e por fim analisar a sensibilidade, especificidade e acurácia do diagnóstico citológico em conjunto com a análise molecular da mutação p.V600E em material de PAAF. Nossa casuística foi composta por 224 pacientes, todos submetidos à tireoidectomia, cuja citologia pré-operatória foi indeterminada (Bethesda classes III a V) ou Bethesda VI (carcinoma papilífero). Foram avaliados dados clínicos e hormonais (TSH) e autoimunidade (anti-TPO e anti-TG), além das características ultrassonográficas (tamanho, estrutura, ecogenicidade, presença de microcalcificação e halo e vascularização). Os dados histológicos avaliados foram tamanho do tumor, variante histológica, invasão de cápsula, invasão vascular e linfática, extensão extratireoidiana, multicentricidade e presença de acometimento ganglionar à cirurgia. Os pacientes foram divididos em grupo benigno (n:122) e maligno (n:102), de acordo com o diagnóstico histológico final. O grupo maligno apresentou uma média de idade menor que o grupo benigno (48,9 vs 54,2 anos; p=0,008). Não observamos diferença entre os grupos com relação à dosagem sérica de TSH (p=0,467), anti-TPO (p=0,535) e anti-TG (p=0,730). Analisando as características ultrassonográficas, o tamanho e o volume dos nódulos foram maiores no grupo benigno (3,0 vs 2,6 cm e 12,38 vs 14,5 cm^3; p=0,008 e

p<0,001, respectivamente). Os nódulos que apresentaram hipoecogenicidade, assim como os nódulos de composição sólida, a presença de microcalcificações, ausência de halo hipoecogênico e presença de vascularização central apresentaram estatisticamente maior freqüência de malignidade. Em modelo de regressão logística, maior idade, nódulo sólido, sem halo hipoecogênico e com microcalcificações foram variáveis que influenciaram conjuntamente na presença de malignidade. No diagnóstico citológico 78,6% (176/224) dos nódulos avaliados foram classe III, IV e V, sendo que destes 35,8% (63/176) apresentaram diagnóstico histológico final maligno. Identificamos a mutação p.V600E no material de PAAF em 67,7% (69/102) dos pacientes do grupo maligno, estando presente em 70,3% (45/64) dos carcinomas papiliferos variante clássica e em 69,7% (23/33) dos carcinomas papilíferos variante folicular, sendo todos os achados confirmados em 100% das amostras através seqüenciamento automático do material obtido do tecido nodular a fresco ou parafinado dos pacientes. Nos pacientes com diagnóstico histológico de CPT (n:98), comparamos os pacientes com e sem a mutação p.V600E com relação aos dados clínicos, histológicos de pior prognóstico, presença de metástase linfonodal, classificação TNM e estádio de acordo com AJCC. Apenas a presença de idade mais avançada apresentou associação estatisticamente significativa com a presença da mutação p.V600E (p=0,041). Comparamos o diagnóstico citológico baseado na classificação de Bethesda e a análise da mutação p.V600E com o diagnóstico histológico considerado o “padrão ouro” para o diagnóstico de CPT. A sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo do diagnóstico citológico foi de 67,4%, 94,4%, 79,8%, 93,3% e 71,2% respectivamente. Análise da mutação p.V600E isoladamente apresentou resultados similares ao do diagnóstico citológico, porém observamos que a combinação do diagnóstico citológico com análise da mutação melhorou significativamente todos os parâmetros analisados. A presença da mutação p.V600E em nossa casuística, não mostrou ser um fator isolado associado à pior prognóstico de CPT. Um maior número de pacientes e acompanhamento a longo prazo, somando-se cuidadosa avaliação clínica-morfológica com a detecção de mutação p.V600E e utilizando análises multivariadas, são necessários para esclarecer o significado prognóstico independente desta mutação. Estudos semelhantes também são necessários para encontrar uma maneira de combinar as características clínicas e ultrassonográficas, com a detecção da mutação p.V600E no material da PAAF para decidir a melhor abordagem cirúrgica.

Descritores: neoplasias da glândula tireoide, ultrassonografia, biópsia por agulha, mutação.

SUMMARY

Lima EU. *Detection of BRAF gene mutation T1799A in papillary carcinoma cells obtained by fine needle aspiration* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, accounting for 1-2% of thyroid malignancies. Currently, the molecular pathogenesis of papillary thyroid carcinoma (PTC) has been linked to aberrant activation of the MAPK signaling pathway, triggered by mutations in several oncogenes. Of these, the p.V600E mutation of *BRAF* gene is the most frequent, being observed in 30%-80% of cases. Several studies have shown that the presence of this mutation is associated with an increased aggressiveness of the tumor and, consequently, a less favorable prognosis, making it an important set PTC. However, few methods used for analyzing samples from fine needle aspiration (FNA) of thyroid nodules were satisfactory regarding cost, time and sensitivity. The objectives of this study were to standardize the DNA extraction from samples obtained from ultrasound (US)-guided FNA of thyroid nodules; validate and determine the efficiency and cost-time of real-time PCR genotyping technique to detect p.V600E mutation from samples of FNA of thyroid nodules, to assess the prevalence of the mutation p.V600E mutation in patients with PTC, correlate the presence of the p.V600E mutation with clinical and histopathological features of higher aggressiveness and finally analyze the sensitivity, specificity and accuracy of cytological diagnosis in conjunction with molecular analysis of the p.V600E mutation in FNA material. Our series consisted of 224 patients, all underwent thyroidectomy, whose preoperative cytology was indeterminate (Bethesda classes III to V) or Bethesda VI (papillary carcinoma). We evaluated clinical data and hormone (TSH) and autoimmunity (anti-TPO and anti-TG), and the sonographic features (size, structure, echogenicity, presence of microcalcifications and halo and vasculature). The histological data were tumor size, histological variant, capsule invasion, lymphatic and vascular invasion, extrathyroidal extension, multicentricity and presence of malignant lymph nodes at surgery. Results: The patients were divided into benign (n:122) and malignant group (n:102), according to the final histological diagnosis. Malignant group had a mean age lower than the benign group (48.9 vs 54.2 years, p=0.008). There were no differences between groups regarding serum TSH (p=0.467), anti-TPO (p=0.535) and anti-TG (p=0.730). According to US characteristics, size and volume of the nodules were higher in the benign group (3.0 vs 2.6 cm and 12.38 cm 3 vs 14.5, p=0.008 and p<0.001, respectively). The nodules that showed hypoechogenicity, as well as the composition of solid nodules, the presence of microcalcifications, absence of hypoechoic halo and presence of central vascularization showed statistically higher frequency of malignancy. In

the logistic regression model, older age, solid nodule without hypoechoic halo and microcalcifications were variables that influenced jointly in the presence of malignancy. In cytological diagnosis 78.6% (176/224) of nodules were evaluated as class III, IV and V, and of these 35.8% (63/176) had final histological diagnosis of malignant. The p.V600E mutation were identified in FNA material in 67.7% (69/102) of patients in malignant group, present in 70.3% (45/64) of papillary carcinoma classic variant and 69.7% (23/33) of follicular variant of papillary carcinoma, and all findings are confirmed in 100% of the samples through sequencing of the material obtained from the surgical tumor (fresh or paraffin). In patients with confirmed PTC (n:98), we compared patients with and without the mutation p.V600E according to clinical, histological poor prognosis, lymph node metastasis, and TNM stage according to AJCC. Only the presence of older age were significantly associated with the presence of the mutation p.V600E (p=0.041). We compared the cytological diagnosis based on the Bethesda classification and mutation analysis with the histological diagnosis p.V600E, the "gold standard" for diagnosis of PTC. Sensitivity, specificity, accuracy, positive and negative predictive value of cytological diagnosis was 67.4%, 94.4%, 79.8%, 93.3% and 71.2% respectively. Analysis of p.V600E mutation alone showed similar results to the cytological diagnosis, but we observed that the combination of cytological diagnosis with mutation analysis significantly improved all parameters analyzed. The presence of the mutation p.V600E in our series was not a single factor associated with worse prognosis of PTC. A larger number of patients and long term follow-up, adding to careful clinical-morphological with p.V600E and mutation detection using multivariate analyzes are needed to clarify the independent prognostic significance of this mutation. Similar studies are also needed to find a combination among clinical and US, with p.V600E mutation detection in FNA material to decide the best surgical approach.

Descriptors: thyroid neoplasms, ultrasonography, biopsy needle, mutation.

INTRODUÇÃO

Câncer da Tireoide

O câncer da tireoide foi primeiramente descrito pelo cirurgião americano William Halsted, a partir de sua ampla experiência com tireoidectomias, quando o denominou de degeneração sarcomatosa (Dumont et al.,1992).

O câncer da tireoide é a neoplasia endócrina mais comum, apresentando uma alta prevalência no mundo. Estima-se que 10% da população podem desenvolver um nódulo palpável durante a vida, devido a diversos fatores: ambientais (exposição à radiação), nutricionais (como os observados em populações iodo-deficiente) e de etiopatogenia desconhecida (Schlumberger et al.,2000). São estimados entre 13.000 e 20.000 novos casos de câncer de tireoide por ano, que promovem cerca de 1.100 a 1.300 mortes anualmente nos Estados Unidos (Jemal et al.,2008). No Brasil, a incidência varia de 0,7 a 3,0 casos em 100.000 habitantes de acordo com a região (Coeli et al.,2005).

Tipicamente, os tumores da tireoide apresentam-se como nódulo único ou multinodular em pacientes assintomáticos e eutireoideos. As mulheres são afetadas mais freqüentemente do que os homens. O prognóstico é melhor para pacientes abaixo dos 40 anos, sem extensão tumoral extracapsular ou invasão vascular (Grant et al.,1988).

De acordo com os achados e critérios morfológicos bem estabelecidos pela *World Health Organization* (WHO), os carcinomas

tireoideanos derivados do epitélio folicular são classificados em: (1) carcinomas bem diferenciados (incluem carcinoma papilífero e suas variantes e carcinoma folicular, (2) carcinomas anaplásicos ou indiferenciados e (3) carcinomas pouco diferenciados (Nikiforov YE, 2004).

O carcinoma papilífero (CPT) é a neoplasia maligna mais comum da tireoide, correspondendo por cerca de 90% dos casos de carcinoma da tireoide. Este tumor é constituído por células foliculares bem diferenciadas, que apresentam alterações nucleares típicas (fendas e pseudoinclusões nucleares, cromatina em “vidro fosco” e irregularidade da membrana nuclear), bem como padrões arquiteturais variados como a formação de papilas, denominando variante clássica ou folículos (variante folicular) ou, ainda, aspectos citológicos diversos como a presença de células oncocíticas (variante oncocítica) ou de células altas (variante de células altas).

Alterações moleculares distintas ou prevalentes encontradas nestes tumores suportam o modelo de progressão tumoral no câncer da tireoide, com isso, estudos moleculares têm proporcionado uma nova visão sobre a tumorigênese tireoidiana, especialmente no CPT, envolvendo a via de sinalização MAPK (DeLellis et al.,2004; Nikiforov YE, 2004; Kondo et al.,2006).

Via de sinalização MAPK

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

As quinases (ou fosfotransferases) são enzimas que transferem grupamentos fosfato de moléculas doadoras de alta energia a moléculas-alvo específicas, catalisando assim a conversão de proenzimas em enzimas ativas, num processo denominado fosforilação (Chong H, 2003). A via de sinalização MAPK estimula a proliferação celular, representando uma via-chave no desenvolvimento, uma vez que media inúmeras funções como crescimento, transformação e apoptose (Chong H, 2003).

Um dos componentes essenciais desta via é a família RAF, composta por serina-treonina quinases. O tipo B da RAF (BRAF) é a proteína mais abundante e potente desta família, capaz de enviar um sinal extracelular para o complexo transmembrana receptor/RAS, ativando assim uma cascata citoplasmática. Quando triplamente fosforilada, a proteína RAF irá ativar outra quinase, a ERK, que por sua vez fosforila proteínas citossólicas e nucleares, denominadas MEK, desencadeando nova reação em cascata até culminar no crescimento e/ou proliferação celular (Xing M, 2005). A ativação

descontrolada desta via é um mecanismo comum e importante para a geração e progressão de tumores em humanos (Figura 1).

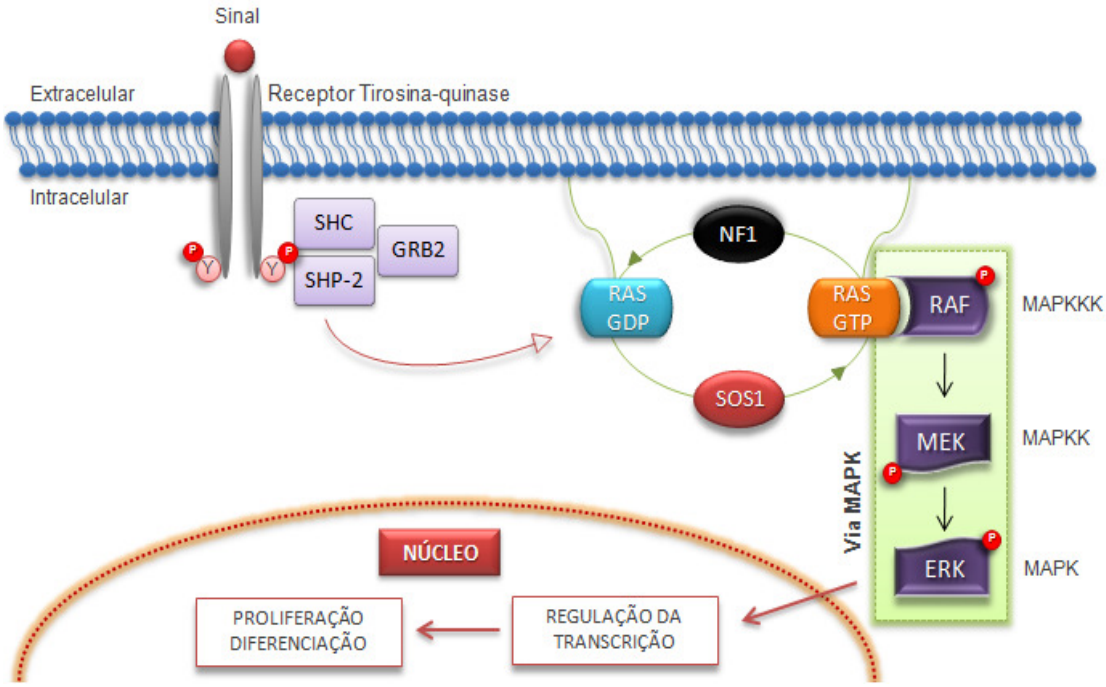

Figura 1: Via de sinalização RAS/MAPK: resíduos de tirosina fosforilada de receptores de tirosina-quinase agem como sítios de ligação para moléculas intracelulares que contém um domínio SH-2, com SHC, SHP-2 e GRB2. Essas moléculas recrutam a proteína a proteína SOS1, que promove a ativação da proteína RAS facilitando a troca de um GPD (inativo) por um GTP (ativo). RAS-GTP ativa diretamente a via MAPK (RAS-MEK-ERK). ERK quinase pode fosforilar substratos citossólicos e nucleares, incluindo fatores de transcrição que regulam o ciclo celular. SHC: *signaling and transforming protein containing Src homology 2 and 3 (SHC2 and SHC3) domains*; SHP-2: *Src homology region 2-domain phosphatase* 2; GRB2: *growth factor receptor-bound protein* 2; SOS 1: *son of sevenless* 1; NF1: *neurofibromin*; RAS*: rat sarcoma viral oncogene homolog*; RAF: *murine sarcoma viral oncogene homolog*; MEK: *mitogen-activated quinase quinase*; ERK: *mitogen-activate quinase* (Ribeiro ACMN, 2011 - modificado).

A regulação tanto de RAS quanto de RAF é crucial para a manutenção do crescimento celular e as transformações nestes genes levam a atividade mutagênica, sendo estes mecanismos regulatórios já bem

compreendidos. Contudo, a regulação da RAF é complexa e envolve a integração de outras vias de sinalização, bem como reações moleculares de fosforilação, desfosforilação e interações interprotéicas (proteína-proteína).

A maioria das alterações genéticas no câncer da tireoide exerce um efeito oncogênico, ao menos parcialmente, através da ativação desta via, como rearranjos RET/PTC (Elisei et al., 2001), mutação em RAS (Fagin et al., 2002) e mutação ativadora em BRAF (Kimura et al.,2003; Xing M, 2007), além das translocações PAX8/PPARγ (Reddi et al.,2006).

Gene *BRAF*

O gene *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) é membro da família de proteínas serina/treonina quinase citoplasmáticas reguladas pela ligação com RAS que incluem três proteínas: A-RAF, B-RAF e C-RAF. As proteínas RAF compartilham três regiões conservadas: CR1 e CR2 na porção N-terminal, sendo altamente reguladas, enquanto que a região CR3 no C-terminal engloba o domínio da quinase (Figura 2).

A isoforma B-RAF exibe a estrutura bilobar característica do grupo das proteína-quinases que, em sua conformação inativa, forma resíduos hidrofóbicos nos domínios 598 a 601 no sítio de ligação com ATP, resultando numa estrutura não propensa à interação com este ou outros substratos (Figura 2). Mutações oncogênicas nesta alça de ativação ou no sítio de ligação com o ATP rompem esta interação hidrofóbica e

desestabilizam a conformação inativa. A troca de uma timina por uma adenina na posição 1799 deste proto-oncogene (c.T1799A) é a mutação de ponto mais conhecida com efeito desestabilizador no gene *BRAF*.

A descoberta de mutações ativadoras para este gene foram otimizadas com o desenvolvimento de ensaios para alterações genéticas sabidamente ativadoras da via MAPK, o que acabou reiterando a importância da mesma na gênese de vários cânceres em humanos (Davies et al., 2002).

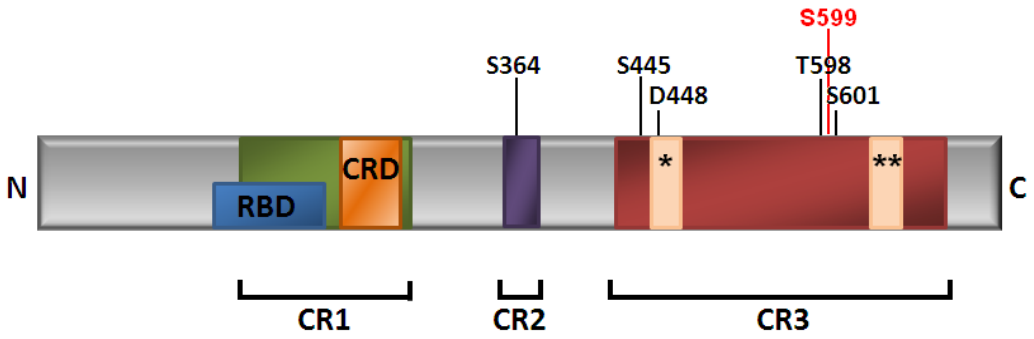

Figura 2: Estrutura do gene *BRAF*, indicando as posições dos sítios de fosforilação potencialmente importantes envolvidos na regulação da ativação da via MAPK. Domínio CR1 possui dois domínios que se ligam ao GTP do gene RAS, o domínio de ligação do RAS (RBD), domínio rico em cisteína (CRD) e também apresenta um domínio de ligação de zinco. Domínio CR2 é rico em resíduos de serina e treonina, alguns dos quais são sítios de fosforilação. Domínio CR3 contém o domínio quinase, sendo este o mais homólogo entre as proteínas RAF, além da região rica em glicina (*) e a região catalítica (**) onde se concentra os resíduos de fosforilação necessários para a atividade da quinase (Mercer et al., 2003 - modificado).

O gene *BRAF* está localizada no cromossomo 7q 34, contém 18 exons que codificam uma proteína de 766 aminoácidos. (Mercer et al., 2003). A mutação missense c.T1799A é a mais freqüente, envolvendo a troca de uma timina por uma adenina na posição 1799 do exon 15, o que

leva à substituição de uma valina por um ácido glutâmico na posição 600 da proteína (p.V600E). Esta mutação insere um resíduo negativamente carregado adjacente ao local de fosforilação *Ser599*, causando a ruptura de ligações hidrofóbicas entre resíduos localizados na região de ligação do ATP, responsável por manter a conformação inativa do gene *BRAF* (Figura 2). Conseqüentemente leva a ativação constitutiva da quinase BRAF, conferindo capacidade oncogênica (Davies et al., 2002; Matsuo et al., 2004; Wan et al., 2004; Ciampi et al., 2005; Hay et al., 2007; Nucera et al., 2009; Tang et al., 2010).

Esta mutação, anteriormente chamada T1796A, era baseada na sequência NM 004333 da base de dados do *National Cancer Institute* (NCI) denominada Gen Bank, a qual carecia de um códon do exon 1 do gene *BRAF*. Com a correção da versão e a vigência da sequência NT 007914, a mutação é hoje designada c.T1799A e passou a ser considerada p.V600E e não mais p.V599E (Kumar et al., 2003).

A mutação p.V600E tem sido reportada em inúmeros tipos de tumores em humanos, em variadas frequências, sendo mais prevalente em melanomas e nevos, 66 e 82%, respectivamente. (Pollock et al., 2003), além de neoplasias colorretais (Benlloch et al., 2006; Brim et al., 2008; Kumar et al., 2009). Nos últimos anos, vários estudos mostraram a presença de mutações no gene *BRAF* em células foliculares do câncer da tireóide, também com alta prevalência.

No CPT, mutações no gene *BRAF* ocorrem numa alta incidência (30% - 80%), não sendo tão significativa em outros tumores tireoidianos, como na

variante folicular do CPT (CPVF), e, curiosamente, parece não ocorrer em carcinomas foliculares da tireoide (CFT). A presença de uma mutação no gene *BRAF* tem sido associada a uma maior agressividade do CPT e, posteriormente, um prognóstico menos favorável, justificando a necessidade de um tratamento mais agressivo (Hay et al., 2007).

Raramente, outras mutações no gene *BRAF* foram descritas. A deleção de três nucleotídeos (GAA) na posição 1800, resultando na eliminação de aminoácido lisina na posição 601 da proteína (p.K601del), ocorre em cerca de 7% dos casos de CPVF (Trovisco et al., 2004) e em linfonodo metastático em associação com a mutação p.V600E (Oler et al., 2005; Hou et al., 2007), não sendo observada na forma clássica ou em outras variantes. A inserção de três nucleotídeos (GTT) na posição 1795, determinando a mutação p.*V599ins,* foi identificada na forma clássica de CPT (Moretti et al., 2006). A inserção de 18 nucleotídeos na posição 1799 (*V600D+FGLAT601-605ins*) e o rearranjo entre os exons 1 - 8 do gene *AKAP9* com os exons 9 - 18 do *BRAF*, designado *AKAP9-BRAF* foram descritas em casos de CPT induzidos por irradiação (Ciampi et al., 2005). Estudos mostraram que todas estas mutações descritas desestabilizam a conformação do gene *BRAF* inativo, causando uma ativação oncogênica constitutiva da proteína BRAF (Sedliarou et al., 2004; Trovisco et al., 2004; Wan et al., 2004; Castro et al., 2005; Ciampi et al., 2005; Kim et al., 2005; Oler et al., 2005; Trovisco et al., 2005; Carta et al., 2006; Moretti et al., 2006; Hou et al., 2007; Ugolini et al., 2007).

Entretanto, devido à baixa freqüência destas mutações, a mutação p.V600E é considerada, na prática clínica, a única mutação associada ao CPT.

Fatores prognósticos para o CPT

Com o intuito de otimizar a abordagem cirúrgica e o seguimento dos pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide (CDT), tem-se buscado identificar fatores prognóstico que possam, essencialmente, dividir esses pacientes em indivíduos de baixo e de alto risco (Gilliland et al., 1997; Hundahl et al., 1998; Shaha AR, 1998; Dean et al., 2000; Hadjieva T, 2001). O sistema TNM é o mais aceito e usado, baseado no diagnóstico histológico e na descrição cirúrgica, levando em conta o tamanho do tumor (T), presença de linfonodos acometidos (N) e metástase à distância (M). De acordo com a American Joint Committee on Cancer (AJCC), o paciente é subdividido em estádios, de acordo com TNM. A exceção são os pacientes abaixo de 45 anos, que são classificados em estádio I, não apresentam metástase à distância, independentemente do TNM. Para pacientes acima de 45 anos de idade, o estadiamento é de I a IV, de acordo com a Tabela 1 (Wittekind et al, 2002).

Tabela 1: Parâmetros utilizados na classificação TNM para câncer da tireoide.

T (Tumor)	**N (Metástases Linfonodais)**	**M (Metástases distantes)**
T1 ≤ 2 cm (T1a ≤ 1 cm T1b 1–2 cm)	**N0** ausentes	**M0** ausentes
T2 2–4 cm	**N1a** metástases no nível VI	**M1** metástases distantes
T3 > 4 cm limitado à tireoide ou com invasão extra-tireoidiana mínima	**N1b** metástases cervicais (laterais) ou em mediastino superior	
T4a invasão de subcutâneo, laringe, traquéia, esôfago ou recorrente laríngeo		
T4b invasão de fáscia pré-vertebral ou envolvimento de carótida ou vasos mediastinais		
Tx tamanho desconhecido sem invasão extra-tireoidiana	**Nx** linfonodos não avaliados	**Mx** não avaliado

Estágios			
Pacientes com < 45 anos			
Estágio I	T1, T2, T3	N0, N1a, N1b, Nx	M0
Estagio II	T1, T2, T3	N0, N1a, N1b, Nx	M1
Pacientes com > 45 anos			
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
Estágio IVa	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0
Estágio IVb	T4b	N0, N1a, N1b, Nx	M0
Estágio IVc	T1, T2, T3	N0, N1a, N1b, Nx	M1

A classificação AJCC foi desenvolvida para prever risco de morte e não recorrência. Para o risco de recorrência, a Sociedade Americana de Tireoidologia (ATA) recomenda uma classificação em três níveis (Cooper DS, 2009):

- Pacientes de baixo risco: (1) ausência de metástases locais ou a distância; (2) dissecção macroscópica total do tumor, (3) não há invasão tumoral dos tecidos ou estruturas loco-regionais; (4) o tumor não apresenta histologia agressiva (por exemplo, carcinoma de células altas, insular ou colunar) ou invasão vascular;

- Pacientes de risco intermediário: (1) invasão microscópica do tumor para os tecidos moles peritireoidianos na cirurgia inicial; (2) tumor com histologia agressiva ou invasão vascular;

- Pacientes de alto risco: (1) invasão tumoral macroscópica, (2) ressecção incompleta do tumor, (3) metástases à distância e, possivelmente, (4) tiroglobulina sérica fora de proporção ao que é visto no exame pós-tratamento com RIT.

O câncer de tireoide ocorre em todas as idades, com dois picos: o menor entre 7 e 20 anos, e o maior entre 40 e 65 anos (Drinkwater et al., 1991). Dados do programa de vigilância epidemiológica norte-americana (Surveillance Epidemiology and End Results program – SEER) e da base norte-americana de dados em câncer (National Cancer Data Base – NCDB) ilustram a importância da idade sobre os índices de sobrevida. Pacientes com CDT, abaixo dos 45 anos de idade são classificados com estádio I ou II,

mostrando sobrevidas de 95% a 100% em 10 anos (Gilliland et al., 1997; Hundahl et al., 1998). Em contraste, pacientes com mais de 70 anos possuem sobrevida menor em 5 anos, 86% e 70%, para CPT e CFT, respectivamente e em dez anos, 65% e 57%, respectivamente (Jemal et al., 2003).

Os homens têm metade da freqüência de CDT que as mulheres, porém o dobro do risco de morte causada pelo câncer. Provavelmente por se acrescentar a maior idade de acometimento nos homens. (Mazzaferri et al., 1994; Mazzaferri et al., 2001).

O acometimento de linfonodos, e consequentemente a sua remoção tem impacto discutível no tempo livre de doença e na sobrevida dos pacientes (Cady B, 1998; Mirallie et al., 1999; Dean et al., 2000). A dissecção sistemática de linfonodos melhora significantemente os índices de recorrência e sobrevida em pacientes com tumores T1 - T3, embora tal conclusão possa não ser aplicável a pacientes de moderado ou baixo risco, nem haja consenso quanto a sua utilidade em termos de diminuição de mortalidade (Sato et al., 1998; Mazzaferri et al., 2001).

A literatura é unânime em relação ao mau prognóstico de pacientes com metástases à distância, que aparecem em 5% a 23% das grandes séries (Mazzaferri et al., 1994; Gilliland et al., 1997; Cady B, 1998; Hundahl et al., 1998; Shaha AR, 1998; Simpson et al., 1988; Schlumberger MJ, 1999; Dean DS et al., 2000; Hadjieva T, 2001; Mazzaferri et al., 2001; Ronga et al., 2002; Chow et al., 2002). Metástases pulmonares causando insuficiência respiratória, hemorragia maciça e obstrução das vias aéreas pelo

crescimento tumoral, juntamente com colapso circulatório decorrente de compressão de veia cava por metástases mediastinais ou externais, são as causas imediatas de morte mais freqüentemente relatadas no CDT (Kitamura el al., 1999) É importante salientar que a mortalidade relacionada às metástases sofre influência da idade mais avançada, da presença de sintomas decorrentes das metástases, de sua localização e do seu tratamento com radioiodo (Shoup et al., 2003). Mesmo os pacientes com metástases ao diagnóstico ou que desenvolvem metástases após a cirurgia têm uma sobrevida de 26% em dez anos (Shoup et al., 2003).

Na verdade, é difícil avaliar o impacto de todos os fatores clínicos e patológicos que, reconhecidamente, influenciam na sobrevida livre de doença (como sexo, tamanho, extensão do tumor e tipo histológico) por causa do diagnóstico precoce e excelente sobrevida da maior parte dos pacientes com CDT.

Valores séricos de TSH e nódulo da tireoide

O aumento dos valores séricos do TSH pode estar associado ao maior risco de câncer da tireoide, ainda que dentro de intervalos normais e também em pacientes com bócio nodular (Boelaert et al., 2006; Moon et al., 2010; Rago et al., 2010).

Boelaert e cols. (Boelaert et al., 2006) estudaram 1.500 pacientes consecutivos sem disfunção da tireoide e encontraram alta probabilidade

para malignidade (OR: 2,72) em indivíduos com TSH entre 1,0–1,7 mU/L, em comparação com TSH menor do que 0,4 um/L. A incidência de malignidade foi ainda maior na presença de níveis de TSH entre 1,8–5,5mU/L (OR: 3,88). Indivíduos do sexo masculino, jovens e com nódulos únicos igualmente apresentaram maior risco.

Fiore e cols. (Fiore et al., 2010) estudaram a relação entre os valores séricos de TSH e CPT em pacientes com bócio uni ou multinodular em eutireoidismo. O objetivo inicial era avaliar a freqüência de CPT em pacientes com nódulos da tireoide tratados (n=7.859) e não tratados (n=20.055) com levotiroxina. Os pacientes tratados apresentaram valores séricos de TSH mais baixos (p<0,0001) e menor prevalência de CPT (3,2 vs 5,1%; p<0,0001). A freqüência de CPT foi menor em pacientes com valores de TSH < 0,4 mU/ml (189/10.059; 1,9%) e mostrou maior incidência em pacientes com TSH > 3,4 mU/ml (21/127; 16,5%). Não foi observada influência da idade ou da presença de nódulo único ou múltiplo. Os autores concluíram que pacientes com bócio nodular (uni ou multinodular) tratados com levotiroxina apresentam menor incidência de malignidade.

Associação entre o CPT e tireoidite autoimune

A incidência de autoanticorpos antitireoglobulina (anti-Tg) e antitireoperoxidase (anti-TPO) é cerca de duas vezes maior em pacientes com CDT, principalmente CPT (Kumar et al., 1994; Souza et al., 2003),

comparando com a população geral (~20 vs. ~10%, respectivamente),

sugerindo uma associação entre doença autoimune da tireoide (DAIT) e CDT (Feldt-Rasmussen et al., 2010). O mecanismo responsável por esta associação provavelmente é multifatorial, pois a tireoidite de Hashimoto e CPT mostram aspectos morfológicos, imunoistoquímicos e moleculares semelhantes (Arif et al., 2002).

Em um estudo brasileiro realizado por Souza e cols. (Souza et al., 2003), demonstraram que a presença de anticorpos, assim como a ocorrência de doença autoimune anterior, indicava melhor evolução nos pacientes com CDT. A chance de um paciente com anticorpo anti-TPO ausente era muito maior de apresentar recorrência, metástase ou morte pelo CDT, em comparação com pacientes com anticorpo anti-TPO positivo (OR:17.053; 95% IC: 2,057-141,34). Provavelmente, a lesão autoimune concomitante ou prévia exerce um efeito protetor na glândula acometida pelo carcinoma (Souza et al., 2003).

Ultrassonografia de nódulos tireoidianos

A ultrassonografia (USG) é o método de escolha para o estudo dos nódulos de tireoide e permite avaliar as dimensões, a localização e as características sugestivas de malignidade, bem como a identificação de linfonodos suspeitos (Hegedus et al., 2003; Maia et al., 2007; Gharib et al., 2008; Bastin et al., 2009; Cooper et al., 2009; Eng et al., 2010; Lew et al., 2010). Os vários estudos disponíveis na literatura demonstram resultados não consensuais, mas apontando para a mesma direção, em relação à valorização da avaliação pela USG dos nódulos tireoidianos que visa determinar as características de malignidade (Boelaert et al., 2006; Cooper et al., 2009; Bastin et al., 2009; Eng et al., 2010; Fiore et al., 2010; Lew et al., 2010; Moon et al., 2010). Segundo Leenhardt e cols. (Leenhardt et al., 1994), a hipoecogenicidade detectada pelo USG possui valor preditivo positivo moderado (50-63%) para malignidade no nódulo da tireoide, com alta sensibilidade (75%) e especificidade (61-83%).

Outros critérios de relevância na predição de malignidade pela USG, classicamente descritos na literatura, envolvem a descrição do diâmetro, das características da borda, textura, microcalcificações e vascularização (Hegedus et al., 2003; Maia et al., 2007; Gharib et al., 2008; Bastin et al., 2009; Cooper et al., 2009; Eng et al., 2010). Li e cols. (Li et al., 2010) revisaram retrospectivamente 115 nódulos de pacientes com CPT. As microcalcificações estiveram diretamente associadas à malignidade do nódulo da tireoide, bem como fluxo central predominante e borda irregular, foram altamente sugestivos de CPT. Por sua vez, Gonzaléz-Gonzaléz e cols. (González-González et al., 2010), em uma análise de 341 nódulos

tireoidianos ao USG, obtiveram a presença de microcalcificações como única variável que manteve associação significativa com malignidade, pela análise de regressão logística, enquanto Moon e cols. (Moon et al., 2010) verificaram presença de fluxo central em nódulos benignos e ausência de fluxo como critério mais freqüente em nódulos malignos, na análise de 1.083 nódulos da tireoide. Esses dados corroboram as conclusões do grupo de Cantisani e cols. (Cantisani et al., 2010), que estudaram os aspectos do fluxo vascular pelo Doppler ao USG de 1.090 pacientes. Os autores concluíram que o padrão de fluxo não pode ser usado isoladamente para prever malignidade com confiança e a punção aspirativa continua sendo obrigatória para definir a natureza do nódulo.

Na busca de se avaliar a correlação desses parâmetros com dados clínicos e laboratoriais, Baier e cols. (Baier et al., 2009) avaliaram os dados ultrassonográficos de 944 nódulos da tireoide e verificaram associação freqüente para nódulos malignos de morfologia predominantemente sólida em indivíduos com menos de 45 anos de idade. Choi e cols. (Choi et al., 2009), não obtiveram associação entre idade e malignidade em nódulos com citologia indeterminada na avaliação inicial. Os autores estudaram 165 pacientes com diagnóstico citológico indeterminado, como diagnóstico final de CFT. Não houve diferença na predição de malignidade quanto ao sexo, idade (≥ 45 anos), tamanho do nódulo e características da USG, a não ser pela presença de fluxo central ao Doppler. Rosário e cols. (Rosário et al., 2010) observaram malignidade presente em 23,5% (24/102) dos casos de citologia indeterminada e 19/25 (76%) destes nódulos tinham características

suspeitas na USG em comparação a 6,5% dos nódulos sem aspectos suspeitos na USG.

De acordo com a literatura, a frequência de malignidade em nódulos da tireoide com diâmetro maior que 4 cm e citologia indeterminada varia entre 10 - 30% (Cox et al., 1991; Rago et al., 2007; Baier et al., 2009; Cooper et al., 2009 ; Choi et al., 2009; Stang et al., 2009).

Punção aspirativa de nódulos tireoideanos

A punção aspirativa com agulha fina (PAAF) foi descrita pela primeira vez em 1948 por pesquisadores escandinavos e aproximadamente uma década mais tarde, começou a ser usada no diagnóstico de nódulos tireoidianos (Belfiore et al., 2001).

A PAAF se apresenta como o método mais importante para a definição de malignidade no manejo e acompanhamento do nódulo de tireoide, mostrando elevada sensibilidade, que varia de 65% a 98% e alta especificidade, que gira em torno de 72% a 100%, sendo considerada como método de referência na avaliação dos nódulos tireoidianos (Gabalec et al., 2009; Eng et al., 2010; Gupta et al., 2010; Li et al., 2010). A taxa de resultados falso-positivos para detecção de câncer varia de 0 a 7% e o de falso-negativos, de 1% a 11% (Gabalec et al., 2009; Eng et al., 2010).

A experiência do médico que realiza a punção é de fundamental importância para a execução do procedimento, e deve ser efetivado

preferencialmente guiado por USG (PAAF-USG). Igualmente relevante é a experiência do patologista que interpreta o material aspirado e determina o diagnóstico citológico que orientará a conduta terapêutica. O procedimento é simples, rápido, seguro, de baixo custo e praticamente desprovido de complicações (Maia et al., 2007; Cooper et al., 2009; Eng et al., 2010; Li et al., 2010).

O diagnóstico citológico no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP adota os seguintes padrões diagnósticos: (1) benigno, (2) maligno, (3) suspeito para neoplasia, (4) insatisfatório ou inadequado como descrito na Tabela 2 (Carneiro PC, 1988).

Segundo a literatura, amostras com resultados indeterminados representam cerca de 15 - 30% (Maia et al., 2007; Cooper et al., 2009; Eng et al., 2010), e o consenso brasileiro recomenda a realização de cintilografia com iodo radioativo nesses casos, com possível indicação cirúrgica diante de um resultado de nódulo frio. Considerando que cerca de 70 - 80% das lesões indeterminadas apresentam um diagnóstico histológico final benigno (Hegedus et al., 2003; Hegedus L, 2004; Gharib et al., 2008; Cooper et al., 2009; Tysome et al., 2009; Eng et al., 2010; Rosário et al., 2010), a indicação cirúrgica nesses casos carece de definição mais precisa, com base em uma análise citopatológica mais detalhada e melhor correlação com os dados da USG, que vem mostrando importantes parâmetros de malignidade nesses casos (Tysome et al., 2009; Eng et al., 2010; Rosário et al., 2010).

Tabela 2: Classificação simplificada utilizada no Serviço de Patologia HC-FMUSP para o diagnóstico citológico de nódulos tireoidianos.

A. Maligno
1. Carcinoma Papilífero 2. Carcinoma Medular 3. Carcinoma Metastático 4. Carcinoma indiferenciado ou pouco diferenciado 5. Linfoma
B. Benigno
1. Bócio adenomatoso 2. Nódulo adenomatoso, nódulo colóide 3. Tireoidite
C. Suspeito para neoplasia folicular (padrão folicular)
1. Bócio adenomatoso 2. Adenoma folicular 3. Carcinoma folicular 4. Carcinoma papilífero variante folicular (variando a ordem de acordo com os achados citológicos).
D. Inconclusivo
Material insuficiente ou com artefato para análise

Carneiro PC, 1988.

Em função da escassez de dados citopatológicos consistentes na literatura, a reunião de 195 especialistas em outubro de 2007, possibilitou a criação da classificação de Bethesda, que vem sendo adotada para nortear o padrão de diagnóstico citopatológico, com importante correlação de malignidade à histologia final desde 2009. Esse sistema consiste na classificação em seis categorias associadas ao risco de malignidade (Cibas et al., 2009). O sistema de Bethesda baseou-se na concordância cito-histológica de 3.207 punções aspirativas de 2.468 pacientes (Tabela 3).

Esse sistema permitiu a uniformidade das informações compartilhadas por patologistas, clínicos e cirurgiões, proporcionando maior correlação entre risco de malignidade e resultado citológico apresentado, possibilitando a definição da conduta mais adequada.

Tabela 3: Classificação citológica pelo Sistema de Bethesda.

I. Não-diagnóstica ou insatisfatória
Somente fluido cístico
Espécime acelular
Outros (sangue, artefato de coagulação, etc.)
II. Benigna
Consistente com nódulo folicular benigno (inclui nódulo adenomatoso, nódulo colóide, etc.)
Consistente com tiroidite linfocitica (Hashimoto) de acordo com contexto clínico
Consistente com tiroidite granulomatosa (subaguda)
Outros
III. Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado.
IV. Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular
V. Suspeito para malignidade
Suspeito para carcinoma papilífero
Suspeito para carcinoma medular
Suspeito para carcinoma metastático
Suspeito para linfoma
Outros
VI. Maligno
Carcinoma Papilífero
Carcinoma pouco diferenciado
Carcinoma medular
Carcinoma indiferenciado (anaplásico)
Carcinoma de células escamosas
Carcinoma com características mistas (especificar)
Carcinoma metastático
Linfoma não-Hodgkin

Outros

Nas citologias benignas e malignas, geralmente não existe dúvida diagnóstica, optando-se por observação e tratamento cirúrgico, respectivamente. Já os padrões citológicos III, IV e V, são as maiores limitações no diagnóstico diferencial entre lesões tireoidianas benignas e malignas. Como sugestão, o sistema Bethesda aponta a probabilidade de lesão maligna em cada uma das categorias com descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Classificação de Bethesda para relatar a citopatologia tireoidiana: risco incluído de malignidade e conduta clínica recomendada.

	Categoria Diagnóstica	***Risco de malignidade (%)***	***Conduta usual*** [a]
I	Insatisfatório ou não-diagnóstica	1–4	Repetir PAAF-USG
II	Benigno	0–3	Seguimento clínico
III	Atipia de significado indeterminado	5–15 [b]	Repetir PAAF
IV	Neoplasia folicular	15–30	Lobectomia
V	Suspeito para malignidade	60–75	Tireoidectomia total ou lobectomia [c]
VI	Maligno	97–99	Tireoidectomia total [c]

[a] Conduta real pode depender de outros fatores (por exemplo, clínico e sonografico) além da interpretação da PAAF.
[b] Estimativa extrapolada a partir de dados histopatológicos com “atipias repetidas vezes.”
[c] No caso de “suspeito para tumor metastático” ou “maligno” indicando tumor metastático e não tumor primário maligno da tireoide, a cirurgia pode não ser indicada.

Apesar da probabilidade de carcinoma da tireoide ser baixa nas categorias III e IV, os pacientes foram submetidos à cirurgia, de acordo com a indicação médica. Já os pacientes com citologia classe V foram sempre

encaminhados para cirurgia, pois a probabilidade de carcinoma é maior. (Cibas et al., 2009).

Diversos parâmetros citológicos e clínico-laboratoriais foram estudados nos últimos anos, na tentativa de se estabelecer preditores de malignidade em nódulos de tireoide, sobretudo, aqueles com citologia indeterminada.

Pesquisa da mutação p.V600E do gene *BRAF* em material de PAAF

De 15% a 20% dos resultados citológicos da PAAF são classificados como padrão folicular ou suspeitos para CPT (Bethesda III, IV e V respectivamente), conseqüentemente, a cirurgia geralmente é necessária para o diagnóstico, apesar de o câncer corresponder a apenas 20%. A detecção de marcadores moleculares para o câncer da tireoide tem sido proposta em material de PAAF no diagnóstico pré-operatório, como imunoistoquímica para galectina-3, HBME-1 (Franco et al., 2009), citoqueratina e telomerase. Porém apresentam resultados limitados, devido à baixa especificidade e sensibilidade das técnicas de detecção utilizadas. Em contrapartida, a literatura mostra que a mutação p.V600E do gene *BRAF* foi identificada entre 28% - 83% das amostras de PAAF com diagnóstico suspeito ou de CPT (Bethesda V e VI, respectivamente) (Salvatore et al., 2004; Xing et al., 2004; Jin et al., 2006; Pizzolanti et al., 2007). A maioria dos estudos em citologia mostra uma alta concordância dos resultados da PAAF

com os encontrados no tecido tumoral. Por causa da especificidade para o CPT, realizar a pesquisa da mutação p.V600E do gene *BRAF* em amostras de PAAF poderia classificar também parte das amostras Bethesda III, IV e V, cujo resultado histológico correspondesse a CPT, ampliando o diagnóstico citológico.

Genotipagem por PCR em Tempo Real

O desenvolvimento da PCR em Tempo Real resultou da complementação da técnica de PCR criada por Mullis KB (Mullis KB, 1987) com a tecnologia de fluoróforos, óptica e informática.

Em uma PCR tradicional, o produto da reação, ou seja, o alvo molecular amplificado exponencialmente é detectado após o término da reação, por eletroforese em gel através da coloração deste produto com um ligante de DNA e obtenção de imagem.

A tecnologia de PCR em Tempo Real prevê a detecção do produto de amplificação à medida que vai sendo formado, ao contrário do método original.

Esta metodologia tem por base a atividade exonucleotídica 5' da Taq DNA polimerase, que promove a ruptura da ligação da sonda que hibridiza com a cadeia complementar por um fenômeno físico denominado FRET (Transferência de energia de ressonância por fluorescência), absorvendo a fluorescência emitida após este ser estimulada por luz de comprimento de

onda específico. Para este efeito são necessárias duas sondas TaqMan® marcadas com dois fluoróforos diferentes, um na extremidade 5', o "reporter", e outro na extremidade 3', o "quencher" (Figura 3).

Enquanto as sondas se mantêm intactas o "quencher" absorve a fluorescência emitida pela sonda "reporter". Durante a PCR e na fase de anelamento, as sondas TaqMan® hibridam com a sua cadeia complementar. Durante a fase de extensão a sonda "reporter" é clivada pela atividade 5' da Taq DNA polimerase, e o floróforo é liberado, ocorrendo assim o aumento do sinal de fluorescência. Com o acumulo do número de ciclos da PCR ocorre o incremento da intensidade da fluorescência, sendo esta proporcional ao aumento do número de produtos de amplificação (Figura 3).

A genotipagem de cada amostra é efetuada através da determinação da intensidade da fluorescência emitida. Um aumento do sinal de fluorescência de um dos fluoróforos indica a presença de um homozigoto para um dos alelos, conforme a cor da fluorescência utilizada na marcação do respectivo alelo. O aumento das duas cores será indicativo da presença de um heterozigoto (Higuchi et al., 1992; Kutyavin et al., 2000; Kubista et al., 2006; Watzinger et al., 2006).

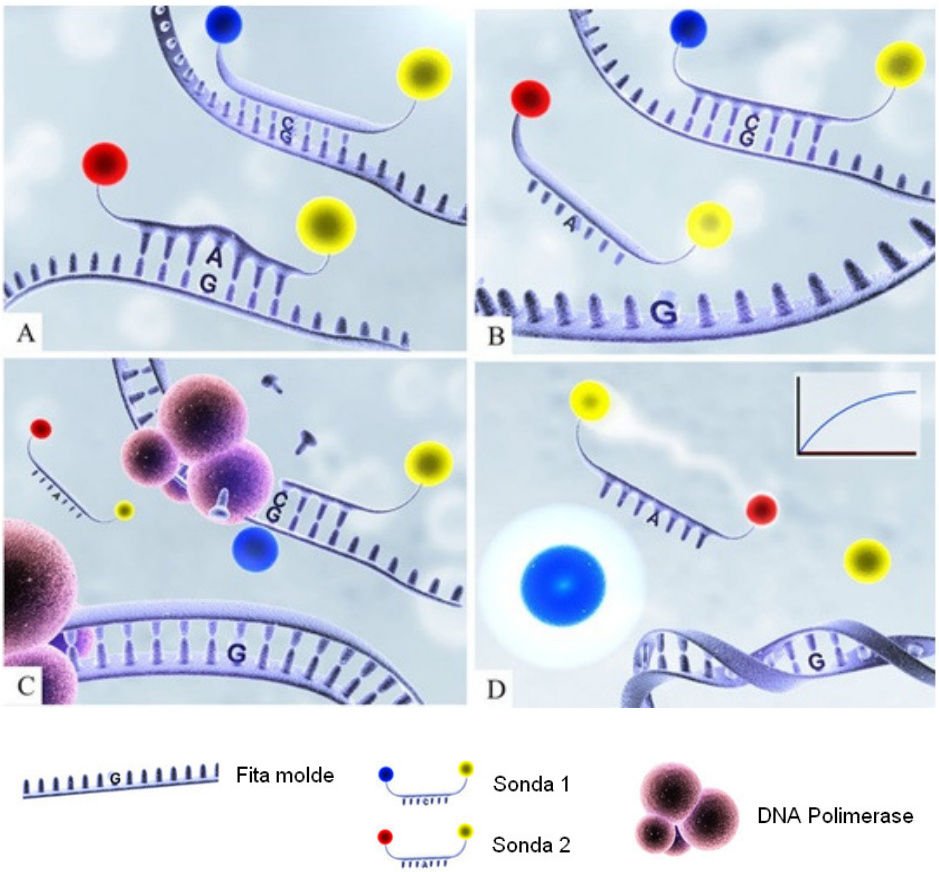

Figura 3: Metodologia TaqMan®: a alteração de interesse é detectada através de duas sondas específicas para cada alelo. (A) A baixa temperatura de hibridização pode causar a ligação das sondas em regiões diferentes do alvo. (B) Com o aumento da temperatura, as sondas se hibridizam perfeitamente com as respectivas regiões alvo. (C) Na etapa de alongamento, com a ação da DNA polimerase, ocorre a liberação do repórter (azul) e do quencher (amarelo). (D) Em cada ciclo ocorre a detecção do sinal de fluorescência, ocorrendo um crescimento exponencial ao longo do tempo.

OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

- Padronizar a extração de DNA a partir de amostras obtidas de PAAF-USG de nódulos tireoidianos.

- Validar e determinar a eficiência e a relação custo-tempo da técnica de genotipagem por PCR em tempo real na detecção da mutação p.V600E do gene *BRAF* em amostras de PAAF de nódulos tireoidianos.

- Analisar a prevalência da mutação p.V600E do gene *BRAF* em pacientes com carcinoma papilíferos da tireoide.

- Correlacionar à presença da mutação p.V600E do gene *BRAF* com características clínicas e histopatológicas de maior agressividade.

- Analisar a sensibilidade, especificidade e acurácia do diagnóstico citológico em conjunto com a análise molecular da mutação p.V600E do gene *BRAF* em material de PAAF.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Casuística

Foram incluídos neste estudo 224 pacientes oriundos das Disciplinas de Endocrinologia e Metabologia e do Departamento de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da FMUSP, entre Janeiro/2009 a Maio/2011, que apresentavam indicação de tireoidectomia (TT) pelo clínico ou cirurgião, sendo submetidos à TT no serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP) e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

Avaliação Hormonal e Autoimunidade

Foi realizada as dosagem séricas de TSH por fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) e dos anticorpos anti-TPO e Anti-TG por fluoroimunoensaio indireto (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) dos pacientes.

Ultrassonografia da tireoide

O exame de USG foi realizado sob a supervisão de médicos experientes do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Facildade de Medicina da USP (Dr. Eduardo Tomimori e Dra. Rosalinda Y.

Camargo) e pelo Departamento de Radiologia do HC-FMUSP. As imagens ultrassonográficas foram obtidas em modo-B, Doppler colorido de amplitude e Doppler pulsado e a documentação foi feita em meio digital. Durante o exame foi analisado a presença de nódulos, o tamanho, número de nódulos, ecogenicidade, presença de microcalcificação, bordas e a presença de halo hipoecogênico em todos os pacientes. Nos nódulos submetidos ao Doppler colorido, a vascularização também foi avaliada.

Diagnóstico citológico das PAAFs

As categorias para o diagnóstico citológico anteriormente utilizado pelo Serviço de Patologia do HC-FMUSP foram descritas por Carneiro PC (1988) de acordo com a Tabela 2 (Carneiro PC, 1988). A partir de novembro de 2010, o Serviço passou a adotar também o sistema de Bethesda, como descrito na Tabela 3 (Cibas et al., 2009).

O diagnóstico citológico baseou-se no sistema de classificação de Bethesda (Cibas et al., 2009). Todas as lâminas contendo material de PAAF-USG foram revisadas por um membro do Departamento de Patologia do HC-FMUSP (Regina Barros Domingues) em companhia do autor, para confirmar os resultados e reclassificar os casos conforme o sistema de Bethesda.

Amostras obtidas de PAAF a fresco de nódulos tireoidianos

Durante o procedimento da PAAF, uma parte do material aspirado pelo médico responsável, foi armazenado em 1 mL de solução salina após a realização de lâminas para o diagnóstico citológico. Antes da extração, o material foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos, e o *pellet* obtido foi armazenado a -20ºC até sua utilização.

- Extração de DNA de amostras obtidas por aspirado de PAAF a fresco

A extração do DNA das amostras de PAAF a fresco foi realizada utilizando o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) (Jo et al., 2009). Em resumo, cerca de 10 µL de cada amostra foram transferidos para um tubo de 1,5 mL, foi adicionado 180 µL do Buffer ATL, 20 µL de Proteinase K, e homogeneizados no vortex durante 15 segundos, e incubada *overnight* a 56℃. Foram adicionados 200 µL do Buffer AL, e homogeneizado por vortex durante 15 segundos. Adicionou-se 200 µL de etanol 100%, e homogeneizado por vortex durante 15 segundos, incubados por 5 minutos a temperatura ambiente (15-25℃). O material foi transferido para a Coluna MinElute QIAamp e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. Adicionou-se 500 µL do Buffer AW1, seguida de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi transferida para um tubo de 2 mL limpo e adicionados 500 µL do Buffer AW2 e centrifugados a 8.000 rpm por 1 minuto. Novamente as

colunas foram transferidas para um tubo de 2 mL limpo, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 3 minutos para que a membrana possa secar completamente. As colunas foram transferidas para um tubo limpo de 1,5 mL e aplicou-se 20 µL do Buffer AE e incubadas à temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos e posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto.

Comparação entre protocolos de extração de DNA de amostras de PAAF a fresco, lavado da agulha de PAAF e de lâminas citológicas de PAAF de nódulos tireoidianos

Primeiramente antes de se realizar a extração de DNA, as lâminas citológicas foram colocadas em banho com xilol histológico por 24 horas, para a retirada da lamínula. Posteriormente o material foi retirado da lâmina com a ajuda de um bisturi e transferido para um tubo tipo eppendorf, onde foi realizado um teste inicial com os cinco protocolos previamente descritos para a extração do DNA (Tabela 5).

Tabela 5: Características dos cinco protocolos para extração de DNA.

Protocolo	Nome	Vendedor	Catalogo no.	Características
1	Fenol/Clorofórmio	N/A	N/A	Proteinase K, extração orgânica e precipitação do DNA
2	Proteinase k	N/A	N/A	Proteinase K e precipitação do DNA
3	Proteinase K e NaCl saturado	N/A	N/A	Proteinase K e precipitação do DNA
4	QIAamp DNA Micro Kit modificado	Qiagen	56304	MinElute Columns
5	QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen	56304	MinElute Columns

N/A: não aplicável.

- <u>Protocolo 1:</u> Foram acrescentados ao tubo, 98 µL de tampão de digestão (10 mM Tris-HCl a 0,1 M; 10 mM de EDTA a 0,2 M) e 2 µL de proteinase K a 20 mg/mL; seguiu-se incubação em banho maria a 56ºC, por no mínimo, 12 horas. Posteriormente, foi realizada a inativação da proteinase K por fervura em banho-maria, a 100ºC por 8 minutos. A precipitação do DNA foi feita com 1 volume de fenol e 1 volume de álcool isoamílico: clorofórmio (1:24), seguida por centrifugação, por 5 minutos, a 10.000 rpm, a fase aquosa foi transferida para novos tubos, onde foram adicionados 1/10 volume de acetato de sódio a 3M e 2 volumes de etanol 100%, para a precipitação do DNA. As amostras ficaram 15 horas à temperatura de -20ºC. Foi realizada uma nova centrifugação, a 14.000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado (Barea et al., 2004). O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água estéril.

- **Protocolo 2:** Foi acrescentado à amostra, 790 µL de tampão de digestão (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, a 1M; 10 mM de EDTA, pH 8 a 0,5M, NaCl a 5M e SDS a 0,5%), mais 10 µL de proteinase K a 20 mg/mL. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho maria a 55ºC, por 12 horas. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de 2 mL. Foram acrescentados 400 µL de cloreto de lítio a 7,5M. As amostras ficaram a -20℃ por 30 minutos, para garantir a precipitação do DNA. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm, por 15 minutos, e o sobrenadante foi colocado em tubo de hemólise estéril. Nesses tubos, foram colocados 2 mL de álcool etílico absoluto, e deixados a -20ºC por 24 horas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm, por 15 minutos, e o sobrenadante desprezado, deixando-se aproximadamente, 200 µL no tubo para ressuspensão do DNA e sua transferência para tubo de 1,5 mL. Um mL de álcool etílico a 70% foi acrescentado, e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 minutos (Vince et al., 1998). O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água estéril.

- **Protocolo 3:** Foi acrescentado à amostra, 200 µL de tampão de digestão (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1% Tween-20, 1% Nonidet P-40) contendo 800 mg/mL de proteinase K. As amostras foram incubadas a 56℃ por 1 h. Após a digestão inicial, 60 µL de NaCl saturado a 6M foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram agitados vigorosamente por 1 minuto, seguido por centrifugação a 3.000 g por 20 minutos. O DNA foi precipitado com 2

volumes de etanol absoluto a -20°C por 40 minutos. Após a centrifugação a 6.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 40 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 0,2mM EDTA, pH 7,4) (Poljak et al., 1995; Poljak et al., 1996).

- **Protocolo 4:** Neste protocolo foram utilizados os reagentes do QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Chatsworth, CA), porém com algumas modificações. Foi acrescentado a amostra, 180 µL de tampão ATL contendo 30 µL de proteinase K. A amostra foi incubada a 55°C por 1 hora. Posteriormente, foi acrescentado 200 µL de tampão AL. A amostra foi incubada a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, 210 µL de etanol 100% gelado foi adicionado e a amostra foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Posteriormente foi transferida para a Coluna MinElute QIAamp e centrifugada a 6.000 g (8.000 rpm) por 1 minuto. Adicionou-se 500 µL do Buffer AW1 na coluna, seguida de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi transferida para um tubo de 2 mL limpo e adicionou-se 500 µL do Buffer AW2 e centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Novamente a coluna foi transferida para um tubo de 2 mL limpo. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a velocidade máxima (14.000 rpm) durante 3 minutos para que a membrana possa secar completamente. Coloca-se a coluna em um tubo limpo de 1,5 mL e aplicou-se 20 µL do Buffer AE, incubando a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minutos, seguido de centrifugação à velocidade máxima (14.000 rpm) por 1 minuto (Jo et al., 2009).

- Protocolo 5: Este protocolo foi baseado no kit comercial QIAamp DNA Micro, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (Jo et al., 2009).

Controles utilizados na genotipagem da mutação p.V600E por PCR em tempo real

- Controle Negativo da mutação: Foram utilizadas duas amostras de leucócitos periféricos de dois pacientes que não apresentaram nenhuma alteração nos exames laboratoriais e ultrassonográficos que não apresentaram a mutação p.V600E no gene *BRAF*. O material foi obtido através das técnicas descritas nos itens: Extração de DNA de leucócitos periféricos e Extração de DNA a partir de material conservado em parafina, após a extração do DNA realizamos o seqüenciamento da região de interesse para confirmação da ausência da mutação p.V600E do gene *BRAF*.

- Controle Positivo Heterozigoto da mutação: Foram utilizados 3 cortes de 10 micras de cada uma das duas amostras de tecido tireoidiano conservado em parafina, derivado de nódulos medindo 1,6 e 1,9 cm^3 com diagnóstico histológico de CPVC, que apresentaram a mutação p.V600E em heterozigose identificada por seqüenciamento. Esse material foi obtido através das técnicas descritas no item: Extração de DNA de material conservado em parafina.

- Controle Positivo Homozigoto da mutação: Foi utilizada a célula NPA derivada de melanoma, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Edna T. Kimura – Universidade de São Paulo, que apresenta a mutação p.V600E em homozigose. Esse material foi obtido através da técnica descrita no item: Extração de DNA de células NPA.

- Extração de DNA de leucócitos periféricos

Foram coletados quinze mL de sangue venoso em tubo de hemograma contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM). Após a hemólise, o conteúdo do tubo foi transferido para um tubo Falcon. Adicionou-se 30 mL de tampão de lise de hemácias (0,079g de NH4HCO3 1mM; 1g de NH4Cl 114mM), homogeneizando por inversão e incubou-se em gelo por trinta minutos. Centrifugou-se o material a 3.000 rpm por quinze minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante. Adicionou-se 30 mL de tampão de lise de hemácias, pela segunda vez, homogeneizando por inversão. Incubou-se no gelo por trinta minutos. O material foi centrifugado a 3.000 rpm por quinze minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 6 mL de tampão TEN (0,5 mL de Tris 10mM, pH 8,0; 2mL de EDTA 10mM; 3,75 mL de NaCl 150mM), 120µL de SDS 10% e 80 µL de proteinase K (100 µg/mL). Homogeneizou-se com pipeta Pasteur e depois o produto foi incubado durante 16 horas a 37°C para que se obtivesse uma solução clara e viscosa. Após a incubação, adicionou-se 2,4 mL de NaCl 6M

e agitou-se vigorosamente o tubo por quinze segundos, centrifugando-se a seguir a 3.000 rpm por quinze minutos a 25°C. O sobrenadante contendo DNA desproteinizado foi cuidadosamente transferido para um tubo Falcon e adicionou-se 40 mL de álcool etílico absoluto a 4°C. O tubo foi invertido diversas vezes até que o DNA precipitasse. O DNA precipitado foi removido com o auxílio de um bastão de vidro. O DNA foi lavado três vezes com 200 µL de álcool etílico a 70% e uma vez com álcool etílico a 100% para remover o excesso de sal. Após secar o material, o DNA foi ressuspendido em 800 µL de solução TE (50 µL de Tris-HCl 2M, pH 7,5; 20 µL de EDTA 0,5 M, pH 8) e incubado a 37°C por duas horas. Até a sua utilização, o DNA foi mantido a 4ºC (Miller et al., 1988).

- Extração de DNA a partir de tecido nodular conservado em parafina

Foram obtidas 3 secções equivalentes a 10 µm para cada microtubo de 1,5 mL. A estes tubos foram adicionados 1 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 5 minutos a 15000 g, posteriormente o sobrenadante foi descartado. Para eliminação eficaz da parafina este passo foi repetido por mais 2 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 5 minutos, a 13000 g a 4°C e o sobrenadante

descartado. As amostras foram secas 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. Foi realizada duas extrações com 500 µL de fenol-clorofórmio. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e centrifugados por 2 minutos a 13.000 xg a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e nova extração (v/v) com fenol-clorofórmio foi realizada. Adicionou-se 40 µL de acetato de sódio 3M e 1 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 13000 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 µL de TE 10:0,1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0 ; EDTA 0,1mM pH 8,0) e estocadas a -20°C até sua utilização.

- Extração de DNA da célula NPA

A célula NPA foi cultivada em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e com 100U/ml de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), em estufa a 37ºC com 5% de CO2.

Após o cultivo, as células foram lavadas com PBS e posteriormente foram aplicados 2 mL de tripsina e incubadas por 2 minutos em estufa a 37oC. Foram acrescentados 2 mL de meio RPMI. O material foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL, seguido de centrifugação a 5 minutos a 1.500 rpm, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Ao pellet foram adicionados 13 mL de tampão de lise de hemácias (0,079g de NH_4HCO_3 1mM; 1g de NH_4Cl 114 mM), homogeneizando por inversão e incubou-se em gelo por trinta minutos. Centrifugou-se o material a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C, desprezando o sobrenadante. Adicionou-se 13 mL de tampão de lise de hemácias, pela segunda vez, homogeneizando por inversão. Incubou-se no gelo por trinta minutos. O material foi centrifugado a 3.000 rpm por quinze minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 6 mL de tampão TEN (0,5 mL de Tris 10mM, pH 8,0; 2mL de EDTA 10mM; 3,75 mL de NaCl 150 mM), 120µL de SDS 10% e 80 µL de proteinase K (100 µg/mL). Homogeneizou-se com pipeta Pasteur e depois o produto foi incubado durante 16 horas a 37°C para que se obtivesse uma solução clara e viscosa. Após a incubação, adicionou-se 2,4 mL de NaCl 6M e agitou-se vigorosamente o tubo por quinze segundos, centrifugando-se a seguir a 3.000 rpm por quinze minutos a 25°C. O sobrenadante contendo DNA desproteinizado foi cuidadosamente transferido para um tubo do tipo falcon e adicionou-se 40 mL de álcool etílico absoluto a 4°C. O tubo foi invertido diversas vezes até que o DNA precipitasse. O DNA precipitado foi removido com o auxílio de um bastão de vidro. O DNA foi lavado três vezes com 200 µL de álcool etílico a 70% e uma vez com álcool etílico a 100% para remover

o excesso de sal. Após secar o material, o DNA foi ressuspendido em 1.000 µL de solução TE (50 ul de Tris-HCl 2M, pH 7,5; 20 µL de EDTA 0,5 M, pH 8) e incubado a 37℃ por duas horas. Até a sua utilização, o DNA foi mantido a 4ºC (Miller et al., 1988 - modificado).

Quantificação de DNA

Após a extração, todas as amostras de DNA foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro Nano Drop 1000 Overview (Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 260nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A qualidade de DNA é essencial para a realização da genotipagem de SNPs por PCR em tempo real, por isso estabelecemos o valor de 1,70 entre as leituras de 260 e 280 nm. Posteriormente as amostras foram diluídas em água destilada para uma concentração final de 10 ng/µL.

Genotipagem da mutação p.V600E do gene *BRAF* utilizando PCR em tempo real

- Desenhos dos primers

Com base na literatura, definimos o conjunto de primers–sondas que formam um fragmento de 176 pb (Benlloch et al., 2006). Os primers foram

desenhados utilizando o programa Primer Express Software versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), sendo submetidas à base de dados Local Alignment Search Tool (BLAST N, BLAST X, e BLAST P) para a busca de seqüências semelhantes. Os fluoróforos escolhidos foram o VIC para detectar o alelo não mutado e o FAM para o alelo mutado (Applied Biosystems, Foster City, CA), como ilustrado na Figura 4.

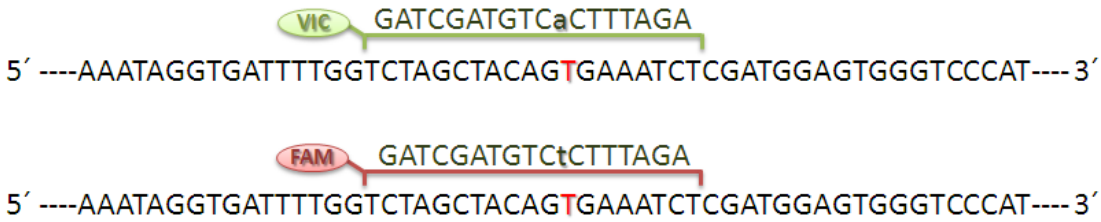

Figura 4: Parte do exon 15 do gene *BRAF,* onde está localizada a mutação p.V600E. 5´VIC representa a sonda sem a mutação (T) marcado pelo fluoróforo VIC; 5´FAM representa a sonda com a mutação (A) marcada pelo fluoróforo FAM (Benlloch et al., 2006 - modificado).

- PCR em tempo real

A reação foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1,25 µL de SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 11,25 µL de DNA, numa concentração de 10 ng/uL. A PCR em tempo real foi feita no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando as condições descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Condições da reação de PCR em tempo real.

Etapa	Tempo	Temperatura
Hold	10 min	95 °C
	x40 ciclos	
Desnaturação	15 seg	92 °C
Anelamento	1 min	60 °C
Extensão	1 min	60 °C

T°C: temperatura de *annealing*.

A análise dos resultados foi feita utilizando o programa StepOne software versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), através do gráfico de discriminação alélica (Figura 5) ou pela curva de amplificação das amostras (Figura 6).

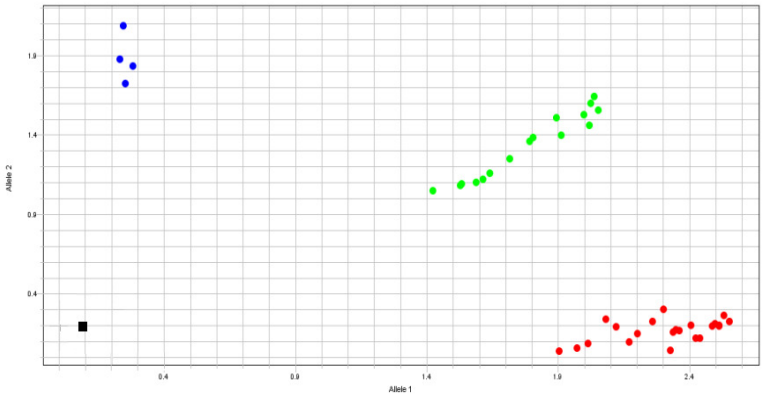

Figura 5: Exemplo de gráfico de discriminação alélica. • Alelo 2: homozigoto, • Alelos 1/2: heterozigoto, • Alelo 1: homozigoto. ■ Controle negativo da reação.

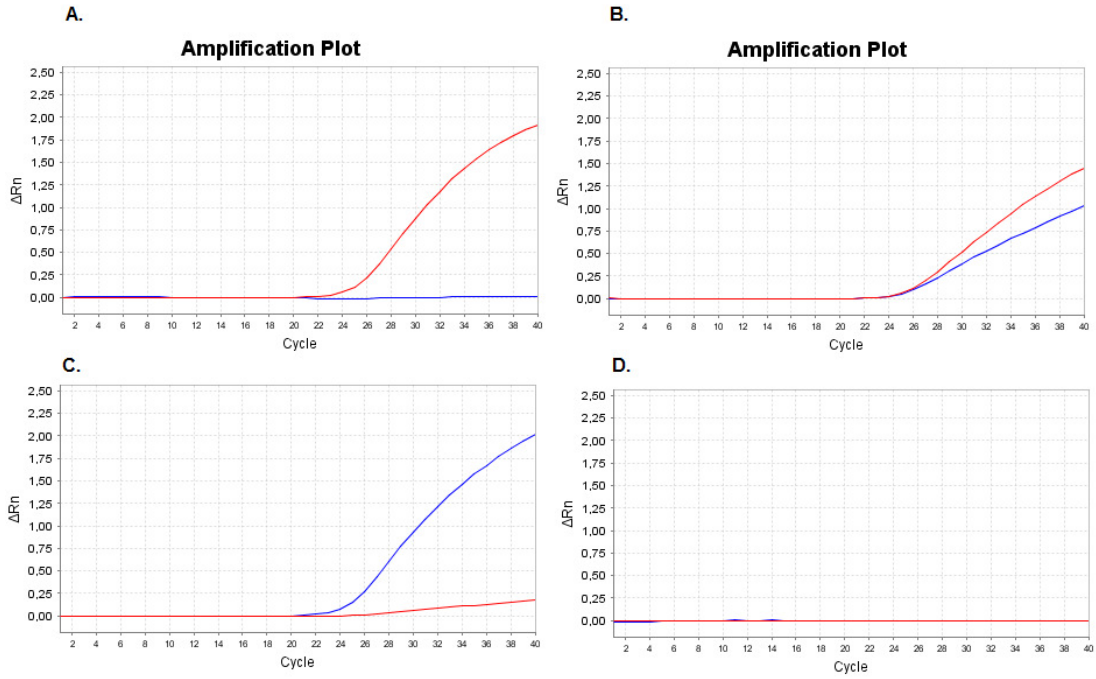

Figura 6: Curva da amplificação de amostras submetidas à genotipagem. (A) Homozigoto para o alelo T. (B) Heterozigoto (T/A). (C) Homozigoto para o alelo A. (D) Controle negativo da reação. — Curva de amplificação correspondente ao alelo A. — Curva de amplificação correspondente ao alelo T.

Extração de DNA a partir de tecido nodular obtido em cirurgia

Nos pacientes encaminhados para a realização de TT, um pequeno fragmento do nódulo avaliado pela PAAF foi coletado e armazenado imediatamente em nitrogênio líquido até a extração de DNA (tecido nodular a fresco). Nos pacientes em que não foi possível realizar a coleta do material no centro cirúrgico, a avaliação foi feita através do tecido nodular conservado em parafina previamente examinado por patologistas experientes do departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), garantindo a presença de tecido tumoral.

- Extração de DNA a partir de tecido nodular a fresco

Os tecidos tumorais removidos cirurgicamente foram mantidos congelados em nitrogênio líquido imediatamente após cirurgia. O DNA foi extraído a partir de pulverização de tecido em nitrogênio líquido com a utilização do Mikro dismembrator U (B. Braun Biotech Internacional). O material pulverizado foi ressuspendido com 5 mL de TE 0,5% SDS (4,75mL TE e 0,25% de SDS-10%). Posteriormente transferido para um tubo Falcon e adicionado 40 µL de proteinase K a 100 ug/mL e incubado a 37°C no agitador durante 24 h. Após esta etapa, foram acrescentados 2 mL de NaCl 5M e agitado vigorosamente por 15 segundos; centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 20°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon e adicionados 2 volumes de álcool absoluto gelado. O DNA foi removido para um tubo eppendorf, onde foi precipitado com etanol 70%, ressuspendido e incubado a 37°C. O DNA foi ressupenso em 50 µL de água destilada e armazenado a 4°C até a sua utilização.

- Extração de DNA a partir de tecido nodular conservado em parafina

Para a extração do DNA foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente para material conservado em parafina.

Análise da mutação p.V600E em tecido nodular

As amostras de DNA obtidas de tecido nodular a fresco ou conservado em parafina foram amplificados através de PCR, utilizando os seguintes iniciadores: 5´ TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG 3´ e 5´ CCACAAAATGGATCCAGACA 3´. A reação de PCR constou das seguintes etapas: 95º C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94º C por 30 seg, 60º C por 30 seg e 72º C por 30 seg, e finalmente uma extensão de 72º C por 7 min. Os produtos de PCR originaram um fragmento de 175 pb.

Os produtos da amplificação foram analisados através 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, Carlbad) ou 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlbad) como padrão de tamanho molecular.

- Seqüenciamento automático

O equipamento utilizado para o seqüenciamento foi ABI Prism 3130*xl* (Applied Biosystems, EUA), empregando o estojo comercial *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, e os mesmos iniciadores empregados na amplificação por PCR.

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

Na amostra purificada, foram adicionados 1,5 µL de *Big Dye Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer*, 1µL de reagente *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Mix* e 0,5 mM do iniciador específico para cada polimorfismo (*sense* ou *antisense*). A reação foi colocada em termociclador VERETI (Applied Biosystems, EUA) por vinte e cinco ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos.

Posteriormente, a reação foi purificada por precipitação, 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 2.000g por 45 minutos a 4°C. Depois se descartou 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 1.650g por 15 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. As amostras foram ressupendidas em 10 µL de formamida e seqüenciadas diretamente.

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências do exon 15 do gene *BRAF* disponíveis em bancos de dados na internet. Neste estudo utilizamos como fonte o site Ensemble Genome Browser (www.ensemble.org/index.html). Para análise das seqüências foi utilizado o

programa *Sequence Scanner v1.0* (Applied Biosystems, EUA) e *Sequencher 4.8* (Gene Codes, EUA).

Avaliação dos achados histológicos obtidos de material cirúrgico

Os dados do tipo histológicos, variante, tamanho do tumor, multicentricidade, presença de invasão capsular, vascular, linfática e extratireoidiana, e a presença de metástase ganglionar ao diagnóstico foram analisados de acordo com a padronização do Serviço de Patologia do HC-FMUSP.

Consideramos a presença de carcinoma de tireoide como achado incidental, quando este carcinoma foi identificado apenas durante o estudo histológico de toda a glândula tireoidiana e não se tratava do nódulo puncionado e estudado.

Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN)

Para calcular a acurácia, sensibilidade e especificidade do sistema de Bethesda e da análise da mutação p.V600E do gene *BRAF*, definimos como verdadeiro-positivos (VP), verdadeiro-negativo (VN), falso-positivos (FP), falso-negativos (FN) os resultados da seguinte forma. Com relação ao

diagnóstico citológico, consideramos como VP os pacientes com diagnóstico citológico e histológico maligno; VN, para os pacientes com diagnóstico citológico e histológico benigno; FN, os pacientes com diagnóstico citológico benigno, mas que no histológico apresentasse malignidade, e FP os pacientes com diagnóstico citológico maligno, mas que no histológico não apresentasse malignidade. Os diagnósticos citológicos classes II e III foram considerados como citologia benigna e os diagnósticos citológicos classes V e VI foram considerados como citologia maligna. Para a avaliação da detecção da mutação, consideramos VP os pacientes com diagnóstico histológico maligno que apresentaram a mutação; VN, os pacientes com diagnóstico histológico benigno que não apresentaram a mutação; FN, para os pacientes com diagnóstico histológico maligno, mas que não apresentaram a mutação, e FP, para os pacientes com diagnóstico histológico benigno que apresentaram a mutação (Lee et al., 2011).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia para o diagnóstico de malignidade foram calculados com base nas formulas (Lee et al., 2011):

Sensibilidade = VP/(VP + FN) X 100;

Especificidade = VN/(VN + FP) X 100;

Acurácia = (VP + VN)/(VP + VN + FP + FN) X 100

Valor Preditivo Positivo (VPP) = VP/(VP + FP) X 100

Valor Preditivo Negativo (VPN) = VN/(VN + FN) X 100

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *SPSS 13.0* e *15.0 for Windows* sob orientação de um estatístico. Todos os testes empregados foram bi-caudais e um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

As variáveis categóricas foram apresentadas por valores absolutos e relativos (freqüências). Comparações entre estas variáveis categóricas foram realizadas por teste chi-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher, com cálculo de risco relativo por "odds ratio" (OR) e seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

As variáveis contínuas foram apresentadas por média±desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP), com discriminação de valores mínimos e máximos, quando indicado. Os testes de normalidade empregados foram Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk, quando menos de 50 casos eram analisados. Quando apresentavam distribuição normal, as comparações entre as variáveis numéricas foram realizadas por teste t-Student (Kirkwood e Sterne, 2006) e one-way ANOVA, e quando apresentavam distribuição não normal, foram realizadas com teste Mann-Whitney, Wilcoxon e Kruskal-Wallis.

Modelo de regressão logística múltipla (Hosmer e Lemeshow, 2000) foi aplicado nas variáveis que apresentaram significância estatística no teste isolado.

RESULTADOS

Avaliação dos achados histológico

Ao considerar toda a casuística, a média do tamanho dos nódulos avaliados na histologia foi de 2,41±1,70 cm (0,3 - 9 cm). O resultado histológico obtido dos pacientes foi de doença benigna em 122 amostras, compreendendo tireoidite de Hashimoto em 5,8% (13/224), bócio em 37,5% (84/224) e adenoma folicular em 11,2% (25/224). Carcinoma tireoidiano foi diagnosticado em 102 pacientes, sendo que carcinoma folicular (CF) estava presente em 1,8% (4/224) dos pacientes, carcinoma papilífero variante clássica (CPVC) em 28,6% (64/224), carcinoma papilífero variante folicular (CPVF) em 14,7% (33/224) e carcinoma papilífero variante oncocítica (CPVO) em 0,4% (1/224).

A distribuição segundo o gênero revelou que 86,8% (106/122) dos pacientes com diagnóstico histológico benigno e 84,3% (86/102) com diagnóstico histológico maligno eram do gênero feminino. Não observamos diferença estatística entre os gêneros dos pacientes de ambos os grupos avaliados (benigno vs maligno p=0,584) (Figura 7).

A média da idade dos pacientes foi de 51,8±15,1 anos (16 - 87 anos). Em 67% (150/224) dos pacientes realizou-se tireoidectomia total (TT), tireoidectomia total com esvaziamento cervical (TT+EC) foi feita em 27,7% (62/224) e lobectomia em 5,3% (12/224).

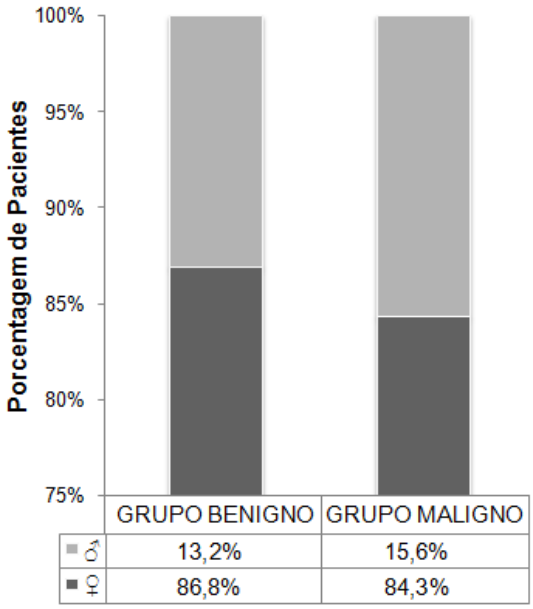

Figura 7: Gráfico representando a comparação dos gêneros feminino e masculino dos pacientes com diagnóstico histológico benigno e maligno (Teste Qui-quadrado).

Os pacientes com diagnóstico histológico benigno apresentaram nódulos com tamanho médio de 3,0±1,8 (0,4 - 10,0 cm). A idade média do grupo foi de 54,2±13,8 (16 - 84 anos), sendo 86,9% (106/122) do gênero feminino. Microcarcinoma papilífero incidental (0,1 a 0,8 cm) foi encontrado em 19,7% (24/122) dos pacientes (Tabela 7).

Tabela 7: Características histológicas dos 122 pacientes do grupo benigno submetidos à cirurgia.

	Bócio n: 84	**Tireoidite n: 13**	**Adenoma n: 25**
Idade	54,8±14,1 (16-84)	57,7±12,9 (37-79)	50,6±13 (19-82)
Sexo			
♀	85,7% (72/84)	100% (13/13)	84% (21/25)
♂	14,3% (12/84)	--	16% (4/25)
Tamanho do Nódulo	2,7±1,8 (0,3-9,0)	2,1±1,3 (0,3-9,0)	2,5±1,5 (0,7-5,3)
Carcinoma Incidental	20,2% (17/84)	7,7% (1/13)	24% (6/25)

Os pacientes com diagnóstico histológico maligno apresentaram nódulos com tamanho médio de 2,2±1,7 cm (0,2 - 9 cm), com uma idade média de 48,9 ±16,2 anos (17 - 87 anos), estatisticamente menor quando comparada a idade média dos pacientes com diagnóstico benigno (p=0,008) (Figura 8).

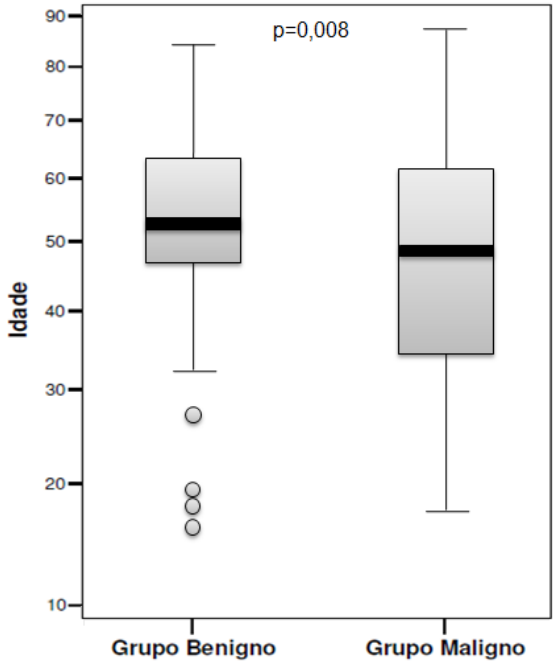

Figura 8: Gráfico representando a comparação da idade dos pacientes com diagnóstico histológico benigno vs maligno (Teste T-Student).

Das características histológicas, observamos que 46,1% (47/102) dos nódulos malignos apresentavam multicentricidade.

Dos 98 pacientes com diagnóstico histológico de CPT, invasão capsular estava presente em 11,2% (11/98), vascular em 10,2% (10/98), linfática em 2% (2/98). Extensão extratireoidiana foi observada em 26,5% (26/98), necrose em 74,14% (7/98), presença de atividade mitótica em 9,2%

(9/98). Vinte e quatro pacientes dos 88 (27,2%) submetidos à TT+EC, apresentaram metástase linfonodal ao diagnóstico histológico (Tabela 8).

Tabela 8: Características histológicas dos 102 pacientes do grupo maligno submetidos à cirurgia.

	CF n:4	CPVC n: 64	CPVF n: 33	CPVO n:1
Idade	45,5±21,1 (17-68)	46,8±14,8 (19-78)	53,4±17,9 (23-87)	41
Sexo				
♀	75% (3/4)	79,7% (51/64)	93,9% (31/33)	1
♂	25% (1/4)	20,3% (13/64)	6,1% (2/33)	--
Descrição Cirúrgica	TT+EC (4)	TT (3) TT+EC (61)	L (1) TT (9) TT+EC (23)	TT (1)
Tamanho do Nódulo	4,4±2,4 (2,2-6,5)	1,8±1,2 (0,2-6,0)	2,6±2,1 (0,2-9,0)	0,4
Carcinoma Incidental	--	--	--	--
Multicentricidade	--	53,2% (34/64)	39,4% (13/33)	1
Invasão Capsular	50% (2/4)	11% (7/64)	12,2% (4/33)	--
Invasão Vascular	--	14% (9/64)	3% (1/33)	--
Invasão Linfática	--	3,2% (2/64)	--	--
Extensão extratireoideana	--	39% (25/64)	3% (1/33)	--
Necrose	--	9,3% (6/64)	3% (1/33)	--
Atividade mitótica	25% (1/4)	6,25% (4/64)	7,8% (5/33)	--
Tecido tireoidiano não neoplásico	Bócio 50% (2/4) Tireoidite 25% (1/4)	Bócio 28,2% (18/64) Tireoidite 31,2% (20/64)	Bócio 45,4% (15/33) Tireoitire 21,2% (7/33) Adenoma 6% (2/33)	Bócio (1)
Metástase Linfonodal	--	32,8% (21/64)	9% (3/33)	--

CF: carcinoma folicular; CPVC: carcinoma papilífero variante clássica; CPVF: carcinoma papilífero variante folicular; CPVO: carcinoma papilífero variante oncocítica; TT: tireoidectomia total; TT+EC: tireoidectomia total + esvaziamento cervical; L: lobectomia.

Avaliação Hormonal

A dosagem sérica de TSH foi realizada em 216 pacientes, com uma média geral de 2,0±1,63 µU/mL (0,03 - 10,9 µU/mL), sendo que 187 pacientes apresentaram os valores séricos de TSH dentro da normalidade (0,4 a 4,5 µU/mL) (Figura 9). Apesar da distribuição de TSH nos grupos benigno e maligno serem diferentes, não houve diferença estatística da dosagem sérica de TSH entre os grupos (p=0,467), como mostrado na Figura 10 e Tabela 9.

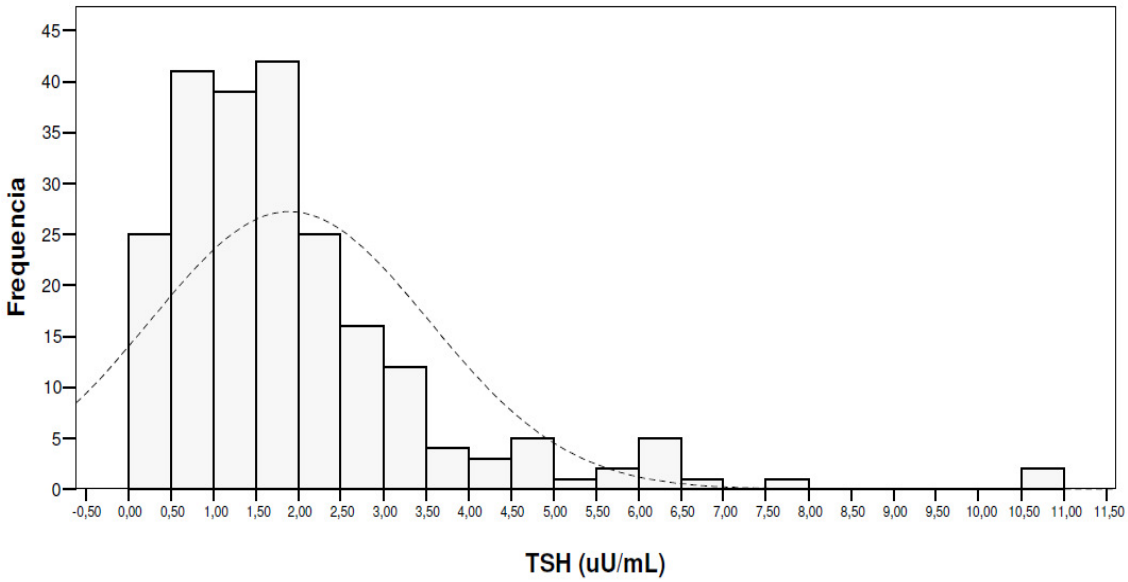

Figura 9: Representação gráfica da mensuração de TSH por fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) dos pacientes que realizaram a PAAF-US. - - - - curva de normalidade sugerida para a população estudada. Valor de referência: 0,4 a 4,5 µU/mL.

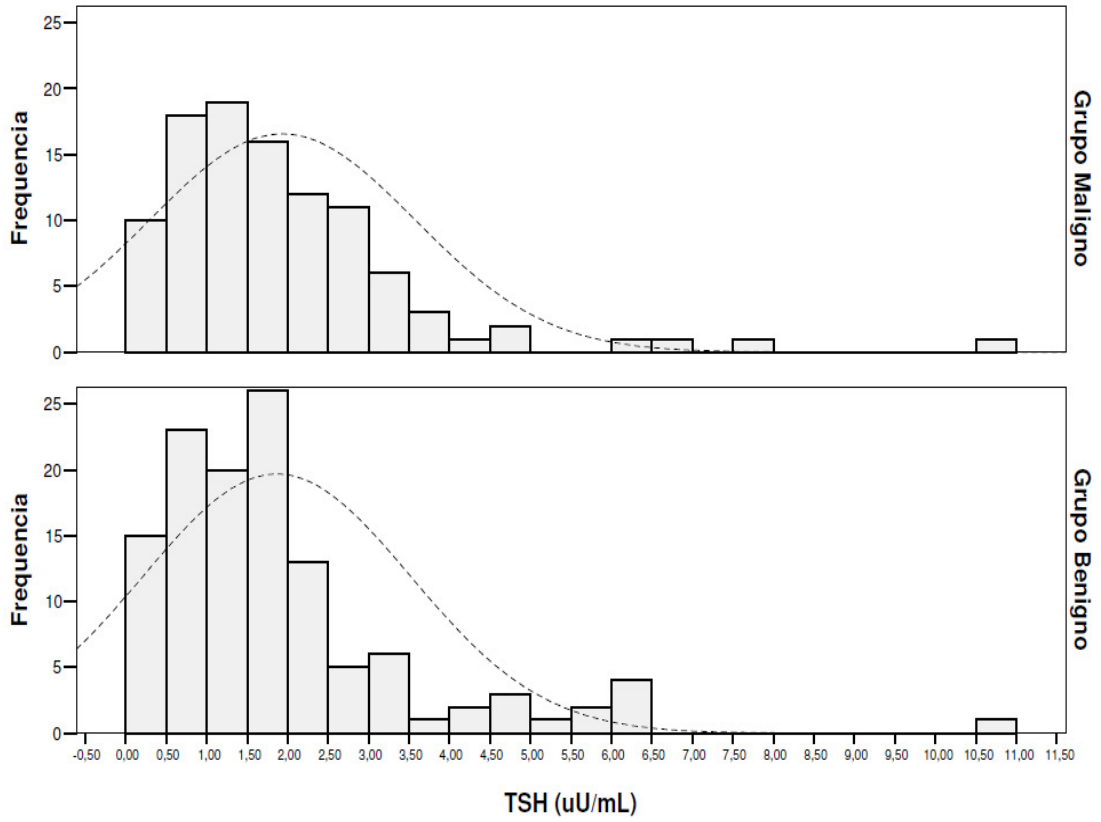

Figura 10: Representação gráfica da mensuração de TSH por fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) dos pacientes com diagnóstico histológico maligno e benigno que realizaram a PAAF-US. - - - - curva de normalidade sugerida para a população estudada. Valor de referência: 0,4 a 4,5 µU/mL (teste Mann-Whitney).

Quarenta e quatro pacientes realizaram a dosagem de TG, apresentando uma média geral de 827,8±3.565,8 ng/mL (0,2 - 23.286 ng/mL), sendo que 40,9% (18/44) apresentaram os valores séricos de TG dentro da normalidade (< 35 ng/mL) (Tabela 9).

A dosagem de anti-TPO foi realizada em 202 pacientes, sendo que 21,3% (43/202) dos pacientes apresentaram resultado positivo, variando de 37 a 3.000 U/mL. No grupo maligno 19,4% (18/93) apresentaram anti-TPO positivo (Tabela 9), sem diferença significante comparando com o grupo benigno (p=0,535).

Cento e noventa e cinco pacientes realizaram a dosagem de anti-TG, sendo que 17,4% (34/195) dos pacientes apresentaram resultado positivo, variando de 37 a 2.200 U/mL (Tabela 9), não havendo diferença estatística entre os grupos benigno e maligno (p=0,730).

Tabela 9: Média, valores mínimos e máximos da dosagem sérica de TSH, TG, anti-TPO e anti-TG dos grupos estudados.

	TSH	TG	Anti-TPO	Anti-TG
Grupo Benigno				
Média±DP	1,87±1,65	213,3±247,0	--	--
Mediana	1,55	79,6	--	--
Variação	0,03 – 10,9	1,2 - 576	52 - 3.000	37 - 1.650
n% (+)	--	--	23% (25/109)	18,4% (18/98)
Grupo Maligno				
Média±DP	1,93±1,64	947,2±3.893,2	--	--
Mediana	1,59	66,3	--	--
Variação	0,19 - 10,59	0,2 - 23.286,0	37 – 1.625	39 - 2.200
n% (+)	--	--	19,4%(18/93)	16,5%(16/97)
VR	0,4-4,5 uU/mL	<35 ng/mL	<35 U/mL	<35 U/mL

DP: desvio padrão; TG: tireogloblina; n%: porcentagem de casos passíveis de avaliação; VR: valor de referência.

Ultrassonografia da tireoide

Foram avaliados 224 nódulos tireoidianos, que foram submetidos à PAAF-USG. Os nódulos avaliados apresentaram no geral um tamanho médio de 2,9±2,0 cm (0,4 - 13 cm).

Os pacientes com diagnóstico histológico benigno apresentaram nódulos com tamanho médio de 3,0±1,8 cm (0,4 - 10 cm), o volume dos nódulos avaliados foi de 12,38±18,2 cm^3 (0,03 – 104 cm^3), sendo que 41% (50/122) eram sólidos, 37% (45/122) hipoecóicos e 20,5% (25/122) apresentavam microcalcificação. Observamos a presença de contornos irregulares em 18% (22/122) e halo hipoecogênico em 54,1% (66/122) dos nódulos. Apenas 19% (11/58) dos nódulos avaliados ao Doppler colorido apresentaram vascularização prodominante central (Tabela 10).

Tabela 10: Dados dos 122 nódulos do grupo benigno avaliados pela USG.

	Tireoidite n: 13	**Bócio n: 84**	**Adenoma n: 25**
Tamanho do nódulo (cm^3)	2,4±1,5 (0,6-5,0)	3,2±1,9 (0,4-10)	2,9±1,6 (0,5-6,6)
Volume do nódulo	6,8±8,8 (0,06-29,6)	14,9±19,9 (0,03-104)	13,4±18,4 (0,1-74,7)
Nódulo			
Sólido	38,5% (5/13)	38% (32/84)	52% (13/25)
Cístico	15,4% (2/13)	4,8% (4/84)	4% (1/25)
Misto	46,2% (6/13)	57,2% (48/84)	44% (11/25)
Ecogenicidade			
Hiperecóico	23% (3/13)	21,5% (18/84)	32% (8/25)
Isoecóico	38,5% (5/13)	44% (37/84)	24% (6/25)
Hipoecóico	38,5% (5/13)	34,6% (29/84)	44% (11/25)
Presença de halo	54% (7/13)	57,2% (48/84)	44% (11/25)
Contorno Irregular	30,7% (4/13)	16,7% (14/84)	16% (4/25)
Microcalcificação	30,7% (4/13)	21,5% (18/84)	12% (3/25)
Vascularização			
Central	12,5% (1/8)	20% (7/35)	20% (3/15)
Periférica	50% (4/8)	51,5% (18/35)	26,7% (4/15)
Mista*	37,5% (3/8)	28,6% (10/35)	53,3% (8/15)

Mista*: vascularização central e periférica.

Os pacientes com diagnóstico histológico maligno apresentaram nódulos com tamanho médio de 2,64±2,26 cm (0,5 - 13 cm) e com volume médio de 14,54±48,07 cm3 (0,02 - 281 cm3). A maioria era nódulo sólido (74,5%; 76/102) e hipoecóico (68,7%; 70/102). Microcalcificação estava presente em 44,1% (45/102) dos nódulos. Contornos irregulares estavam presentes em 28,4% (29/102) e presença de halo hipoecogênico em 39,2% (40/102) dos nódulos. Dos nódulos avaliados ao Doppler colorido 42,6% (23/54) apresentaram vascularização predominante central (Tabela 11).

Tabela 11: Dados dos 102 nódulos do grupo maligno avaliados pela USG.

	CF n:4	**CPVC n: 64**	**CPVF n: 33**	**CPVO n: 1**
Tamanho do nódulo (cm^3)	8,15±5,6 (2,8-13)	2,0±1,4 (0,5-6,7)	3,2±2,2 (0,6-9,4)	1
Volume do nódulo	148±153,5 (13,7-281)	4,9±8,8 (0,02-39,3)	25,3±54,8 (0,09-212,4)	0,13
Nódulo				
Sólido	75% (3/4)	76,6% (49/64)	69,7% (23/33)	1
Cístico	--	1,6% (1/64)	--	--
Misto	25% (1/4)	21,8(14/64)	30,3% (10/33)	--
Ecogenicidade				
Hiperecóico	25% (1/4)	9,4% (6/64)	18,2% (6/33)	--
Isoecóico	--	15,6% (10/64)	27,2% (9/33)	--
Hipoecóico	75% (3/4)	75% (48/64)	54,5% (18/33)	1
Presença de halo	50% (2/4)	36% (23/64)	45,5% (15/33)	--
Contorno Irregular	--	36% (23/64)	15,1% (5/33)	1
Microcalcificação	--	51,6% (33/64)	33,3% (11/33)	1
Vascularização				
Central	75% (3/4)	55% (11/20)	37,5% (6/16)	--
Periférica	--	20% (4/20)	18,7% (3/16)	1
Mista*	25% (1/4)	25% (5/20)	43,7% (7/16)	--

CF: carcinoma folicular; CPVC: carcinoma papilífero variante clássica; CPVF: carcinoma papilífero variante folicular; CPVO: carcinoma papilífero variante oncocítica; Mista*: vascularização central e periférica.

Analisando as características descritas na USG, observamos que o tamanho e o volume dos nódulos foram significativamente maiores no grupo benigno (p=0,008 e p<0,001, respectivamente).

Os nódulos que apresentavam hipoecogenicidade, assim como os nódulos de composição sólida, a presença de microcalcificações, a ausência de halo hipoecogênico e detecção de vascularização central apresentaram estatisticamente maior freqüência no grupo maligno (Tabela 12).

Tabela 12: Descrição das características ultrassonográficas dos nódulos dos grupos benigno e maligno segundo os resultados dos testes de associação.

	Grupo Benigno		**Grupo Maligno**			**p**
	Total	%	Total	%	Total	
Ecogenicidade						**<0,001**
Hiperecóico	29	69	13	31	42	
Isoecóico	48	71,6	19	28,4	67	
Hipoecóico	45	39,1	70	60,9	115	
Nódulo						**<0,001***
Sólido	50	39,7	76	60,3	126	
Cístico	7	87,5	1	12,5	8	
Misto	65	72,2	25	27,8	90	
Presença de halo						**0,026**
Ausente	56	47,5	62	52,5	118	
Presente	66	62,3	40	37,7	106	
Contornos irregulares						0,065
Ausente	100	57,8	73	42,2	173	
Presente	22	43,1	29	56,9	51	
Microcalcificações						**<0,001**
Ausente	97	63,0	57	37,0	154	
Presente	25	35,7	45	64,3	70	
Vascularização						**0,032**
NR	64	57,1	48	42,9	112	
Central	11	32,4	23	67,6	34	
Periférico	26	65,0	14	35,0	40	
Mista	21	55,3	17	44,7	38	

NR: não relatado; * teste da razão de verossimilhanças (teste qui-quadrado).

Realizamos a elaboração de um modelo de regressão logística e observamos que a idade, nódulo sólido, ausência de halo hipoecogênico e presença de microcalcificação são variáveis que influenciam conjuntamente na presença de nódulos malignos (Tabela 13). O aumento da idade acarreta redução na chance de malignidade. Frente a nódulos sólidos, a chance de malignidade é 4,02 vezes maior em relação ao nódulo misto. A presença de microcalcificações acarreta aumento na chance de malignidade de 3,51 vezes. A presença de halo hipoecogênico diminui em 47% a chance de malignidade (Tabela 13).

Tabela 13: Resultado do modelo de regressão logística para verificar as variáveis que influenciam conjuntamente na presença de nódulos malignos.

Fator	**OR**	**IC (95%)**		**p**
		Inferior	Superior	
Idade	0,98	0,96	1,00	**0,018**
Nódulo				
Sólido	4,02	2,15	7,51	**<0,001**
Cístico	0,50	0,06	4,52	0,541
Misto	1,00			
Presença de halo				
Ausente				
Presente	0,53	0,29	0,96	**0,037**
Microcalcificações				
Ausente	1,00			
Presente	3,51	1,81	6,80	**<0,001**

Diagnóstico citológico das PAAFs

Dos diagnósticos citológicos, classificaram 78,6% (176/224) em classe III, IV e V, sendo que destes 35,8% (63/176) apresentavam diagnóstico histológico final de CDT.

Tabela 14: Diagnóstico citológico das PAAFs com base no sistema de Bethesda.

	GRUPO BENIGNO			GRUPO MALIGNO				
	Tireoidite n: 13	Bócio n: 84	Adenoma n: 25	CF n: 4	CPVC n: 64	CPVF n: 33	CPVO n: 1	Total
VI	--	--	1	--	31	8	--	40
V	--	6	1	1	19	9	1	37
IV	--	5	8	1	3	3	--	20
III	10	68	15	2	11	13	--	119
II	3	5	--	--	--	--	--	8

CF: carcinoma folicular; CPVC: carcinoma papilífero variante clássica; CPVF: carcinoma papilífero variante folicular; CPVO: carcinoma papilífero variante oncocítica.

Padronização da técnica de genotipagem por PCR em tempo real

As amostras de DNA de PAAF a fresco e do lavado da agulha de PAAF, extraídas utilizando o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Chatswoth, CA) apresentaram baixa concentração e um alto grau de impureza. Entretanto obtivemos a amplificação do exon 15 do gene BRAF por PCR convencional, com os iniciadores anteriormente descritos (Figura 11).

Realizamos a padronização da técnica de genotipagem por PCR em tempo real do gene BRAF, utilizando os controles negativos, positivos heterozigotos e os positivos homozigotos para a mutação p.V600E do gene BRAF.

Observamos pequenas amplificações das amostras com os DNAs extraídos de amostras de PAAF a fresco e do lavado da agulha de PAAF, mesmo alterando a temperatura de anelamento dos *primers*. Devido à baixa

amplificação, o equipamento não conseguiu gerar o gráfico de discriminação alélica adequado para análise dos resultados (Figura 12 e 13).

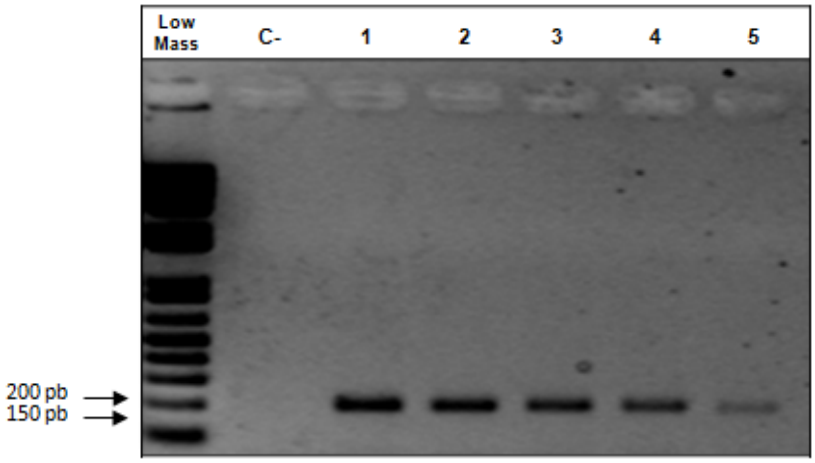

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos amplificados do exon 15 do gene *BRAF*. A primeira coluna indica o marcador de peso molecular (Low Mass). C-: controle negativo da reação. As colunas indicam os produtos amplificados de 175 pb: (1) controle positivo homozigoto para a mutação p.V600E; (2) controle negativo para a mutação p.V600E; (3) controle positivo heterozigoto para a mutação p.V600E; (4) amostra de PAAF a fresco; (5) amostra de lavado de agulha.

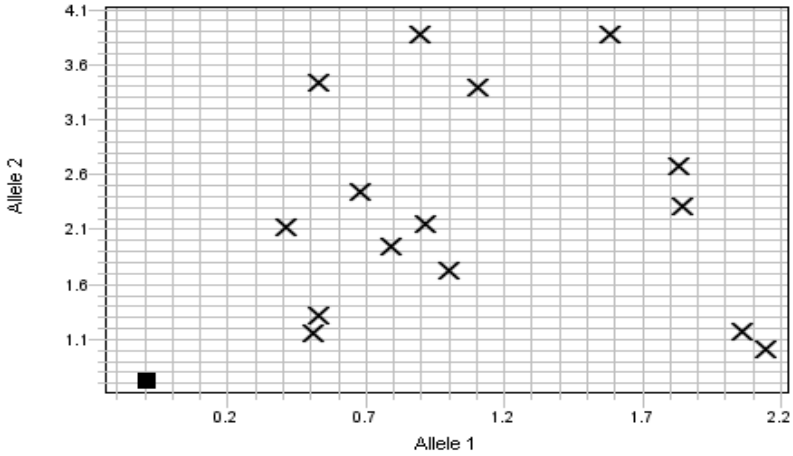

Figura 12: Gráfico de discriminação alélica gerado nos testes realizados com os DNAs extraídos de PAAF utilizando o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). X: amostra não identificada. ■Controle negativo da reação.

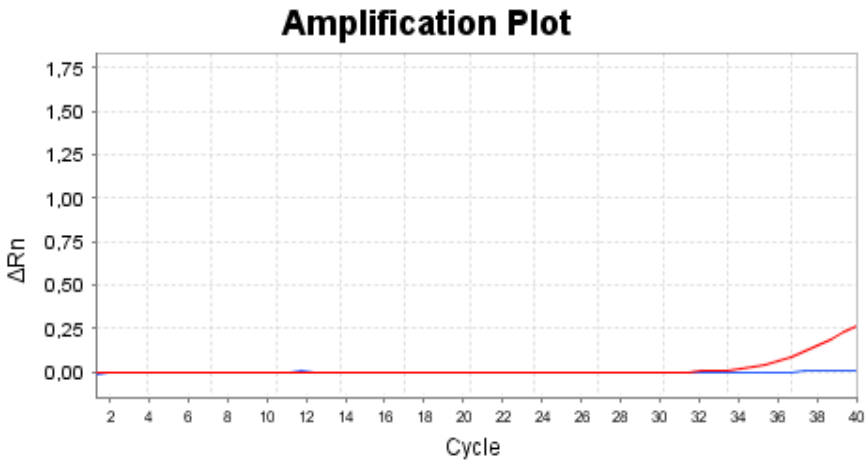

Figura 13: Curva de amplificação das amostras utilizadas nos testes. — Curva de amplificação correspondente ao alelo A. — Curva de amplificação correspondente ao alelo T.

Comparação entre protocolos de extração de DNA de amostras de PAAF a fresco, lavado da agulha de PAAF e de lâminas citológicas de PAAF de nódulos tireoidianos

Utilizando o kit QIAamp DNA Micro (Qiagen, Chatsworth, CA), optamos por mudar a nossa metodologia, pois o DNA obtido diretamente da PAAF apresentou alto grau de impureza e em quantidade inferior a necessária para a realização da técnica de genotipagem por PCR em tempo real. Por se tratar de um material escasso, o kit não se mostrou eficaz para esse tipo de amostra.

Realizamos um levantamento no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e selecionamos 480 lâminas citológicas de 224 pacientes que realizaram PAAF-USG no período de Setembro/2008 a Março/2011, sendo que desses, 37 já estavam em nossa casuística.

Primeiramente, realizamos um teste piloto com amostras pareadas de 2 pacientes, ou seja, as amostras da PAAF a fresco e da respectiva lâmina citológica. Para cada um dos 5 protocolos testados foram usadas 2 lâminas citológicas e 2 amostras do PAAF a fresco de cada um dos pacientes.

No teste piloto, a extração de DNA foi realizada utilizando os cinco protocolos anteriormente descritos, sendo que as amostras da PAAF a fresco independentemente do protocolo utilizado, apresentaram uma concentração total de DNA menor, variando de 51,13 ± 34,39 ng/µL (140,5-12,1 ng/µL), do que das lâminas citológicas, variando de 288,93 ± 420,70 ng/µL (1510,1-49,8 ng/µL) (Tabela 15).

Os protocolos para extração de DNA não apresentaram diferença entre si quando comparados em conjunto (p=0,056). (Figura 14A). Entretanto, o protocolo 1 apresentou maior eficiência na concentração de DNA (qualitativa e quantitativamente) quando comparado aos demais protocolos (p<0,005), principalmente em comparação ao protocolo 5 (Figura 14B). Os DNAs extraídos das amostras de PAAF a fresco não apresentaram diferença usando os diferentes protocolos testados (p=0,412). Já nas lâminas citológicas, o DNA obtido pelo protocolo 1 apresentou maior quantidade quando comparados a todos os outros protocolos testados (p=0,008), inclusive quando comparado ao protocolo 5 (p=0,029).

Após os testes de extração, realizamos a genotipagem por PCR em tempo real com todas as amostras de DNA. Observamos uma melhor amplificação das amostras de DNA extraídas pelo protocolo 1.

Para confirmação, realizamos uma comparação entre as amostras de PAAF a fresco, lavado da agulha e das lâminas citológicas correspondentes de 37 pacientes utilizando os Protocolos 1 e 5.

Tabela 15: Concentração e qualidade do DNA (razão de 260/280) das amostras de PAAF a fresco, correspondentes as lâminas citológicas de PAAF utilizadas no teste piloto.

	Protocolo 1		**Protocolo 2**		**Protocolo 3**		**Protocolo 4**		**Protocolo 5**	
	ng/µL	**260/208**	**ng/µL**	**260/208**	**ng/µL**	**260/208**	**ng/µL**	**260/208**	**ng/µL**	**260/208**
P1										
Lâmina	890,1	1,70	117,50	1,0	162,20	1,2	103,50	1,8	82,1	1,6
Lâmina	600	1,80	137,30	1,6	54,20	1,8	91,10	1,7	70,3	1,2
PAAF	105,4	1,30	69,10	1,6	73,50	1,2	57,60	1,8	32,1	1,0
PAAF	78,3	1,40	15,00	1,1	17,10	1,8	84,90	0,5	27,8	1,4
P 2										
Lâmina	1189,9	1,72	104,20	1,1	87,90	1,6	71,60	1,8	60,8	1,9
Lâmina	1510,1	1,72	95,60	1,3	210,00	1,1	90,40	1,3	49,8	1,2
PAAF	72,5	1,50	140,50	1,2	51,20	1,3	12,10	1,6	42,8	1,2
PAAF	48,7	2,68	22,10	1,2	12,80	2,1	21,80	1,1	37,3	1,5

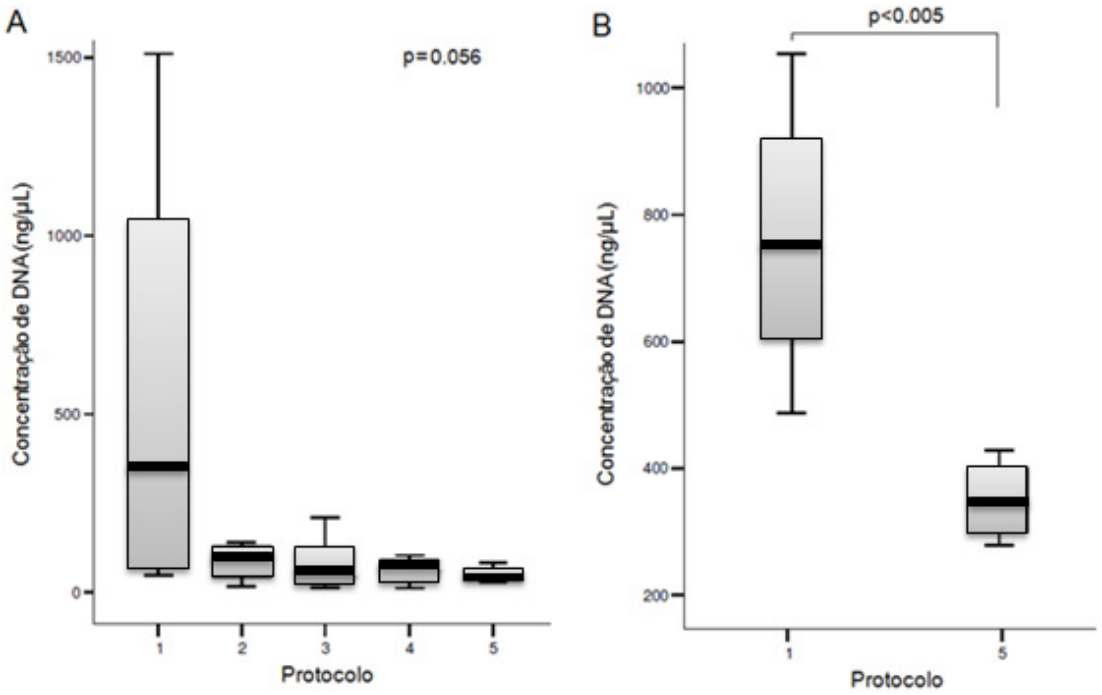

Figura 14: (A) Gráfico da comparação da concentração do DNA extraído das amostras de PAAF a fresco e lâmina citológica de PAAF dos pacientes P1 e P2, utilizando os cinco protocolos testados (Teste Kruskal-Wallis). (B) Gráfico da comparação da concentração do DNA extraído das amostras de PAAF a fresco e lâmina citológica de PAAF dos pacientes P1 e P2, utilizando os protocolos 1 e 5 (Teste Mann-Whitney).

Observamos que as lâminas citológicas continuaram apresentando uma maior quantidade de DNA, em comparação com as de PAAF a fresco e do lavado da agulha ($p<0,001$) (Tabela 16 e Figura 15). Apenas três amostras apresentaram uma concentração de DNA inferior a 10 ng/µL. Essas amostras foram classificadas como inconclusivas pelo diagnóstico citológico.

Tabela 16: Concentração do DNA (ng/µL) obtido através dos três diferentes tipos de amostras.

	PAAF a fresco	Lavado da agulha	Lâmina citológica
Média ±DP (ng/µL)	80,3 ± 104,3	19,2 ± 20,2	618,8 ± 783,8
Mediana (ng/µL)	45,9	9,4	267,1
Mínimo (ng/µL)	1,1	2,9	4,2
Máximo (ng/µL)	544,2	79,9	3.483,5

DP: desvio padrão

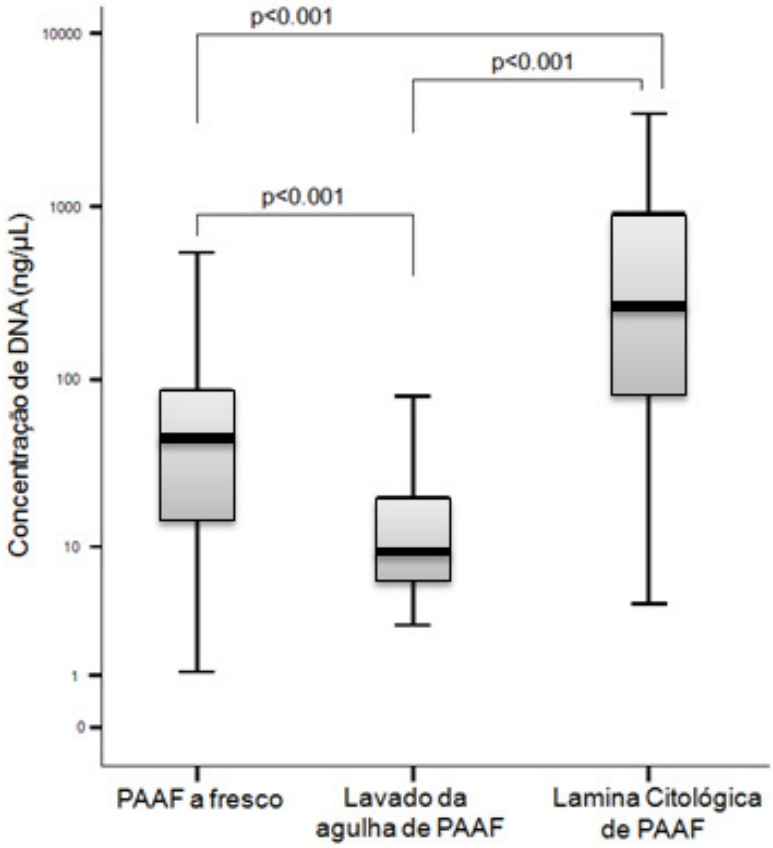

Figure 15: Gráfico da concentração do DNA extraído das amostras de PAAF a fresco, lavado da agulha de PAAF e das lâminas citologicas de PAAF dos 37 pacientes avaliados (Teste Mann-Whitney).

As amostras de DNA foram avaliadas quanto à qualidade através da leitura em espectrofotômetro para a relação 260/280 (Tabela 17 e Figura 16).

Tabela 17: Leitura da absorbância 260/280nm das amostras de DNA obtidos através dos três diferentes tipos de amostras.

	PAAF a fresco	Lavado da agulha	Lâmina citológica
Média ± DP (ng/µL)	1,9± 3	2,4±3,6	1,7±0,31
Mediana (ng/µL)	0,92	1,2	0,87
Mínimo (ng/µL)	0,8	2,7	1,14
Máximo (ng/µL)	13,9	30	4,23

DP: desvio padrão

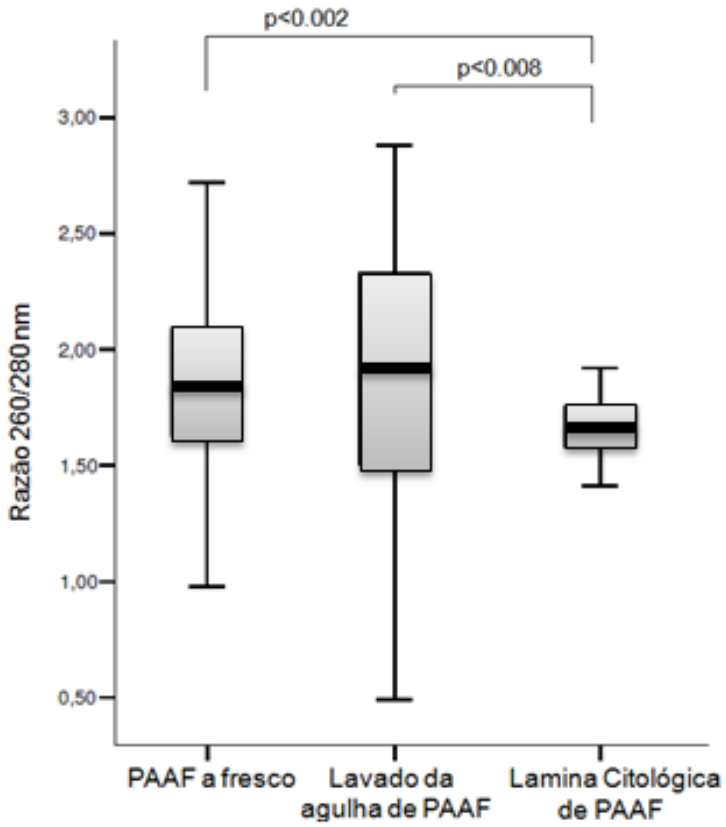

Figura 16: Gráfico da relação da leitura de absorbância 260/280 nm das amostras de DNA obtidas de PAAF a fresco, lavado da agulha e lâmina citológica de 37 pacientes avaliados (Teste Mann-Whitney).

A análise do DNA obtido de lâminas citológicas mostrou menor variação da relação 260/280, indicando também maior pureza, em comparação com os demais métodos de obtenção. As amostras de lavado de agulha apresentaram a maior variação na quantidade e qualidade do DNA obtido (Figura 16).

Para genotipagem por PCR em tempo real, todas as amostras obtidas de PAAF a fresco e de lâminas citológicas foram amplificadas com sucesso. Entretanto apenas 7 das 31 amostras de lavado da agulha de PAAF foram amplificadas, confirmando menor concentração de DNA e/ou impureza do material.

Os DNAs obtidos de lâminas citológicas apresentaram os maiores valores de intensidade de fluorescência (ΔRN) para ambos os alelos, facilitando a discriminação alélica (Tabela 18). Comparando-se os valores de ΔRN, tanto mais quanto menos expressos entre os diferentes métodos de obtenção de DNA, a melhor discriminação foi obtida usando as lâminas citológicas ($p<0,001$). O mesmo foi visto na presença ou ausência da mutação p.V600E (Tabela 18).

Tabela 18: Valores da intensidade de fluorescência (ΔRN) de ambos os alelos das amostras com e sem a mutação p.V600E do gene *BRAF*.

p.V600E		**ΔRN Alelo T**	**ΔRN Alelo A**
Presente			
	PAAF a fresco	0,262 (1,079 - 0,005)	0,085 (0,857 - 0,005)
	Lavado da agulha	0,925 (1,040 - 0,060)	0,050 (0,101 - 0,041)
	Lâmina citológica	1,459 (5,128 - 0,050)	1,446 (4,144 - 0,031)
Controle			
	Homozigito - T	1,732 (2,617 - 0,932)	0,325 (0,462 - 0,105)
	Heterozigoto - T/A	1,924 (4,392 - 0,912)	1,871 (4,574 - 0,873)
	Homozigoto - A	1,257 (1,807 - 1,231)	0,225 (0,331 - 0,207)
Ausente			
	PAAF a fresco	0,745 (1,470 - 0,005)	0,092 (0,916 - 0,001)
	Lavado da agulha	0,074 (0,151 - 0,062)	0,030 (0,068 - 0,025)
	Lâmina citológica	1,504 (3,920 - 0,098)	0,265 (1,105 - 0,047)

Nas amostras positivas para a mutação p.V600E, o ΔRN das amostras de lâmina citológica foi próximo ao dos controles utilizados (Figura 17). Portanto indicando que a melhor obtenção de material para o presente estudo foi usando as lâminas citológicas.

Ao realizarmos os cálculos para determinar o custo por extração para cada um dos dois protocolos usados, observamos que o protocolo 5 é cerca de 7 vezes mais caro que o protocolo 1, sendo que conseguimos obter 3 vezes mais material pelo protocolo 1. Com relação ao tempo, ambos os protocolos necessitam de mais de 24 horas para o início e fim do procedimento (Tabela 19).

Tabela 19: Comparação do custo e tempo necessário para a extração de DNA de uma amostra, utilizando os protocolos 1 (Fenol/Clorofórmio) e 5 (QIAamp DNA Micro Kit).

Protocolo de Extração	Material		R$	Duração (Horas)	Volume Final	N° de extrações
Protocolo 1						
	Reagentes		0,88			
	Microtubo de 1,5ml	2 un	0,08			
	Ponteira c/ filtro 10ul	2 un	0,34			
	Ponteira c/ filtro 200ul	6 un	1,02			
Total (R$)			**2,32**	**28**	**50 µL**	**N/A**
Protocolo 5						
	Kit QIAamp DNA Micro	1	15,41			
	Microtubo de 1,5 ml	4 un	0,16			
	Ponteira de 10 e 20 ul	3 un	0,51			
	Ponteira de 200 e 1000 ul	6 un	1,02			
Total (R$)			**17,1**	**25**	**15 µL**	**50**

N/A: não aplicável.

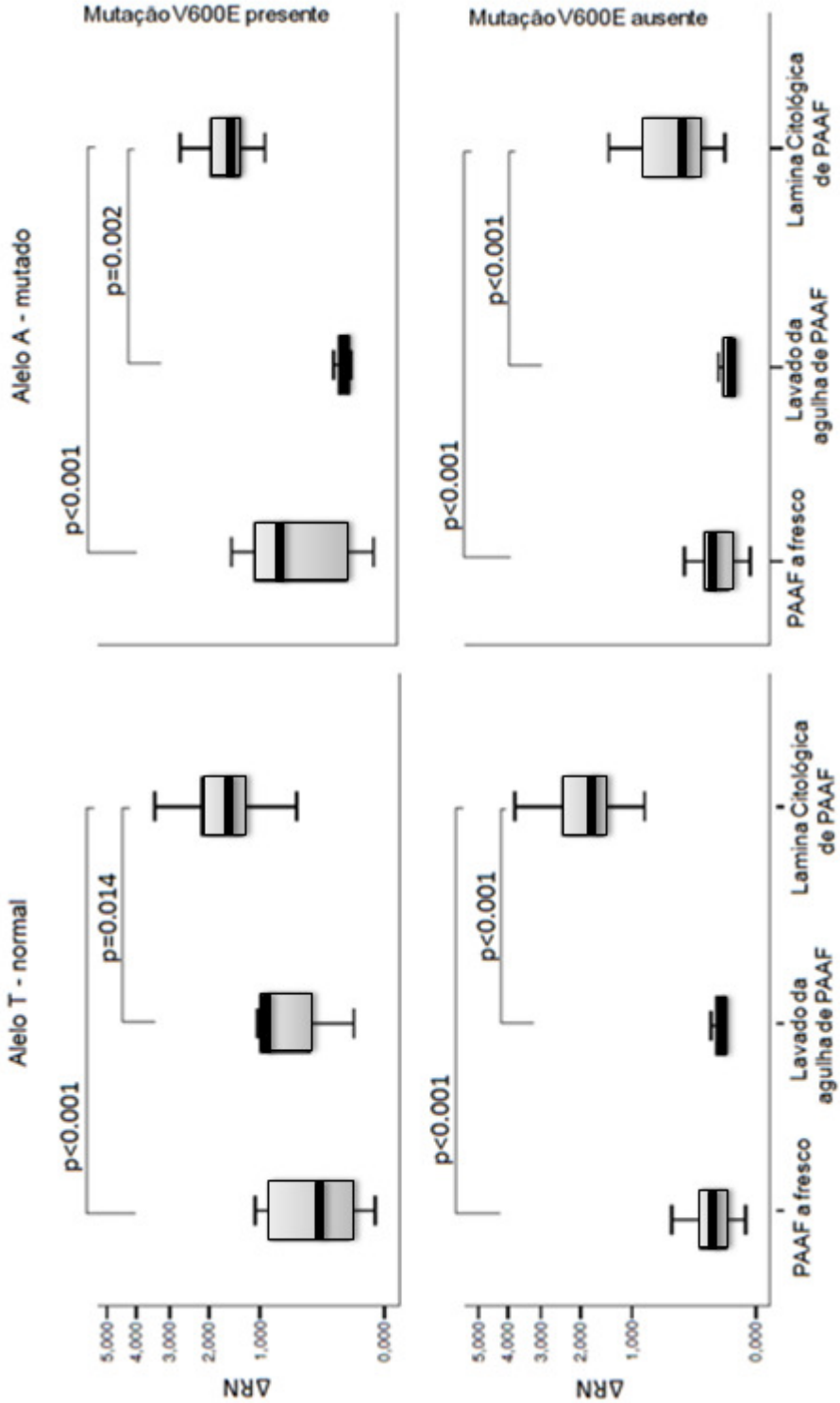

Figura 17: Gráfico dos valores da intensidade de fluorescência (ΔRN) de ambos os alelos das amostras de PAAF a fresco, lavado de agulha de PAAF e lâmina citológica de PAAF com ou sem a mutação p.V600E, através da técnica de genotipagem por PCR em tempo real (Teste Mann-Whitney).

Análise da mutação p.V600E

Identificamos, através da técnica de genotipagem por PCR em tempo real, a mutação p.V600E do gene *BRAF* no material de PAAF em 67,7% (69/102) dos pacientes com diagnóstico histológico maligno, estando presente em 70,3% (45/64) dos CPVC e em 69,7% (23/33) dos CPVF (Tabela 20). Não identificamos a mutação p.V600E nos 112 pacientes com diagnóstico histológico benigno (Tabela 20).

Confirmamos os achados obtidos nas amostras de PAAF dos nódulos avaliados dos grupos benigno e maligno através de seqüenciamento automático do material obtido do tecido nodular a fresco ou parafinado dos pacientes, confirmando em 100% os achados obtidos pela técnica de genotipagem por PCR em tempo real.

Tabela 20: Identificação da mutação p.V600E pela técnica de genotipagem por PCR em tempo real dos pacientes do grupo benigno e maligno, de acordo com o diagnóstico histológico.

	GRUPO BENIGNO			**GRUPO MALIGNO**				
p.V600E	Tireoidite n: 13	Bócio n: 84	Adenoma n: 25	CF n: 4	CPVC n: 64	CPVF n: 33	CPVO n: 1	Total
Presente	--	--	--	--	45	23	1	69
Ausente	13	84	25	4	19	10	--	155

CF: carcinoma folicular; CPVC: carcinoma papilífero variante clássica; CPVF: carcinoma papilífero variante folicular; CPVO: carcinoma papilífero variante oncocítica.

A mutação p.V600E do gene *BRAF* foi identificada em 23,3% (41/176) dos pacientes com diagnósticos citológicos classe III, IV e V (Tabela 21).

Tabela 21: Identificação da mutação p.V600E por genotipagem dos pacientes do grupo benigno e maligno, de acordo com o diagnóstico citológico.

	Tireoidite	Bócio	Adenoma	CF	CPVC	CPVF	CPVO	Total	p.V600E
VI	--	--	1	--	31	8	--	40	28
V	--	6	1	1	19	9	1	37	19
IV	--	5	8	1	3	3	--	20	4
III	10	68	15	2	11	13	--	119	18
II	3	5	--	--	--	--	--	8	--

CF: carcinoma folicular; CPVC: carcinoma papilífero variante clássica; CPVF: carcinoma papilífero variante folicular; CPVO: carcinoma papilífero variante oncocítica.

Nos pacientes com diagnóstico histológico de CPT, comparamos os pacientes com e sem a mutação p.V600E de acordo com os dados clínicos e histológicos de prognóstico. Apenas a idade mais avançada apresentou associação com a presença da mutação p.V600E (p=0,041), como descrito nas Tabelas 22 a 24.

Tabela 22: Descrição das características clínicas, laboratoriais e da USG dos pacientes com CPT com e sem a mutação p.V600E.

	p.V600E	Média	DP	MD	Mín.	Máx.	N	p
Idade	Ausente	44,12	15,54	46	17	77	33	**0,041***
	Presente	51,12	16,14	52	23	87	69	
TSH	Ausente	1,91	2,09	1,19	0,38	10,59	33	0,220
	Presente	1,95	1,39	1,71	0,03	7,67	69	
Tamanho – USG	Ausente	3,43	3,23	2,5	0,5	13	33	0,243
	Presente	2,26	1,49	1,7	0,6	9,2	69	
Volume o – USG	Ausente	28,08	74,23	0,95	0	281	33	0,740
	Presente	8,07	26,61	1,29	0	212,4	69	
Tamanho - DH	Ausente	2,53	2,26	1,9	0,2	9	33	0,855
	Presente	2,00	1,34	1,5	0,3	6,5	69	

DH: diagnóstico histológico; DP: desvio padrão; MD: mediana; Mín.: mínimo; Máx.: máximo (Teste Mann-Whitney; * Teste T-Student).

Tabela 23: Características descritas na USG dos pacientes com CPT com relação à ausência e presença da mutação p.V600E.

	Mutação p.V600E				Total	p
	Ausente		Presente			
	n	%	n	%		
Sexo						0,918
♀	28	32,6	58	67,4	86	
♂	5	31,3	11	68,8	16	
Anti-TPO**						0,913
+	24	32,0	51	68,0	75	
-	6	33,3	12	66,7	18	
Anti-Tg**						0,603
+	25	30,9	56	69,1	81	
-	6	37,5	10	62,5	16	
Ecogenicidade						0,611**
Hiperecóico	4	30,8	9	69,2	13	
Isoecóico	8	42,1	11	57,9	19	
Hipoecóico	21	30,0	49	70,0	70	
Nódulo						0,278**
Sólido	23	30,3	53	69,7	76	
Cístico	1	100,0	0	0,0	1	
Misto	9	36,0	16	64,0	25	
Presença de halo						0,088
Ausente	24	38,7	38	61,3	62	
Presente	9	22,5	31	77,5	40	
Contornos irregulares						0,264
Ausente	26	35,6	47	64,4	73	
Presente	7	24,1	22	75,9	29	
Microcalcificações						0,812
Ausente	19	33,3	38	66,7	57	
Presente	14	31,1	31	68,9	45	
Vascularização						0,213**
NR	17	35,4	31	64,6	48	
Central	10	43,5	13	56,5	23	
Periférico	2	14,3	12	85,7	14	
Mista*	4	23,5	13	76,5	17	

NR: não relatado; Mista*: vascularização central e periférica (Teste Qui-Quadrado; *Teste da razão de verossimilhanças; **Nem todos foram avaliados para esta variável.

Tabela 24: Características histológicas dos pacientes com CPT com relação à ausência e presença da mutação p.V600E.

	Mutação p.V600E				Total	p
	Ausente		Presente			
	n	%	n	%		
Multicentricidade						0,275
Ausente	21	36,8	36	63,2	57	
Presente	12	26,7	33	73,3	45	
Invasão capsular						0,342*
Ausente	27	30,3	62	69,7	89	
Presente	6	46,2	7	53,8	13	
Invasão vascular						0,724*
Ausente	29	31,5	63	68,5	92	
Presente	4	40,0	6	60,0	10	
Invasão linfática						>0,999*
Ausente	33	33,0	67	67,0	100	
Presente	0	0,0	2	100,0	2	
Extensão extratireoidiana						0,241
Ausente	27	35,5	49	64,5	76	
Presente	6	23,1	20	76,9	26	
Necrose						>0,999*
Ausente	31	32,6	64	67,4	95	
Presente	2	28,6	5	71,4	7	
Atividade mitótica						0,286*
Ausente	28	30,4	64	69,6	92	
Presente	5	50,0	5	50,0	10	
Tecido tireoideano não neoplásico						0,575**
NR	11	30,6	25	69,4	36	
Tireoidite	8	30,8	18	69,2	26	
Bócio	14	36,8	24	63,2	38	
Adenoma	0	0,0	2	100,0	2	

NR: não relatado (Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher; **Teste da razão de verossimilhanças).

Avaliamos a presença de metástase linfonodal, classificação TNM e estádio de acordo com AJCC. A presença de metástase linfonodal só foi levada em consideração quando foi realizado o esvaziamento cervical, pois o nosso Serviço realiza este procedimento apenas na presença de linfonodos acometidos na avaliação pré-operatória ou como protocolo de pesquisa. Porém não observamos uma associação com a mutação p.V600E

com a presença de metástase linfonodal, TNM e estádio (p>0,05) (Tabela 25).

Tabela 25: Descrição da análise da presença de metástase linfonodal, classificação TNM e estádio de acordo com AJCC.

	Mutação p.V600E				Total	p
	Ausente		Presente			
	N	%	N	%		
Metástases linfonodal**						0,836
Ausente	16	39	25	61	41	
Presente	8	36,4	14	63,6	22	
T						0,656*
1	15	31,9	32	68,1	47	
2	3	20	12	80	15	
3	12	37,5	20	62,5	32	
4	3	37,5	5	62,5	8	
N**						0,225
0	14	50	14	50	28	
1	8	33,3	16	66,7	24	
ESTADIO						0,576*
I	23	34,3	44	65,7	67	
II	1	12,5	7	87,5	8	
III	8	34,8	15	65,2	23	
IV	1	25	3	75	4	

Teste Qui-Quadrado; *Teste da razão de verossimilhança; **Nem todos foram avaliados para esta variáve.

Comparação entre as metodologias de seqüenciamento automático e genotipagem por PCR em tempo real

Realizamos uma comparação entre o seqüenciamento automático e a PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan® levando em consideração o tempo e custo para estabelecer a metodologia mais eficiente para a detecção da mutação p.V600E do gene *BRAF*.

Para a realização do seqüenciamento automático, o tempo foi de 3 dias versus 1 dia para a PCR em tempo real. O custo foi de R$ 73,81 para o

seqüenciamento automático contra R$ 23,25 da PCR em tempo real (Tabela 26).

Considerando como padrão ouro a metodologia de seqüenciamento automático, a sensibilidade e a especificidade de ambas as metodologias foi de 100%.

Tabela 26: Custo comparativo das metodologias usadas neste trabalho para análise de uma amostra.

Técnica	Material	Quantidade	R$	Análise (dias)
PCR (Polymerase Chain Reaction)				
	Go Taq Master Mixes	1 reação	2,05	
	DNTP	0,5µl	0,41	
	Magnésio	0,5µl	0,01	
	Primers	2,0 µl	7,5	
	Microtubo de 0,6ml	1 un	0,06	
	Ponteira com filtro 10ul	5 un	0,81	
	Ponteira com filtro 20ul	1 u	0,18	
	Agarose	1,5 g	5,55	
	100 pb DNA Ladder	0,5µl	7,56	
Seqüenciamento automático				
	Exo-Sap It	1 µl	3,608	
	Reagente Big-Dye V3.1	1 µl	27,43	
	Primers	0,5µl	1,87	
	Acetato de sódio	1 µl	0,000011	
	Álcool etílico	49,5 µl	0,0014	
	Formamida Hi-Di	10 µl	1,15	
	Solução tampão com EDTA - eletroforese	50ml	1,47	
Total (R$)			**R$ 73, 87**	**3 dias**
Genotipagem por PCR em tempo real				
	TaqMan SNP Genotyping Assays	1,25 µl	4,16	
	TaqMan GT Master Mix	12,5µl	3,43	
	Microtubo de 0,1ml	1 un	0,45	
	Ponteira com filtro 10ul	5 un	0,81	
	Ponteira com filtro 20ul	1 un	0,18	
Total (R$)			**R$ 23, 25**	**1 dia**

Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN)

Comparamos o diagnóstico citológico baseado na classificação de Bethesda e análise da mutação p.V600E com o diagnóstico histológico considerado o "padrão ouro" para o diagnóstico de CPT. A sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN do diagnóstico citológico foi de 67,4%, 94,4%, 79,8%, 93,3% e 71,2% respectivamente (Tabela 27). Análise da mutação p.V600E isoladamente apresentou resultados similares ao do diagnóstico citológico, porém observamos que a combinação do diagnóstico citológico com análise da mutação p.V600E melhorou significativamente todos os parâmetros analisados (Tabela 27).

Tabela 27: Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) dos métodos utilizados.

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP	VPN
Sistema de Bethesda	67,4%	94,4%	79,8%	93,3%	71,2%
Mutação p.V600E	63,4%	100%	80,3%	100%	70,1%
Bethesda + p.V600E	78,5%	94,4%	91,4%	100%	87,5%

DISCUSSÃO

O carcinoma da tireoide é a causa mais freqüente de câncer de cabeça e pescoço. Sua incidência vem aumentando nos últimos anos, entretanto a taxa de mortalidade mantém-se a mesma (Davies et al., 2006). Entre os cânceres da tireoide, o CPT é o mais freqüente.

O diagnóstico histológico é atualmente a base sobre a qual é exercida a estratificação do risco para pacientes com câncer da tireóide (Xing M, 2007), considerando os fatores clássicos de alto risco: idade, tamanho do nódulo, metástase linfonodal, invasão extratireoidiana e capsular (Tanaka K et al, 2005).

Em nossa casuística, os pacientes com diagnóstico histológico maligno apresentavam uma média de idade menor que os pacientes com diagnóstico benigno (48,9 vs 54,2 anos, p=0,008), pois a doença mais frequentemente encontrada no grupo benigno foi bócio que classicamente acomete indivíduos mais idosos.

Embora haja uma proporção de 5 a 11 vezes maior de nódulos da tireoide em indivíduos do sexo feminino, a incidência anual de câncer da tireoide nos EUA gira em torno de 1,2 a 2,6 por 100.000 indivíduos em homens e 2,0 a 3,8 por 100.000 mulheres (Coeli et al., 2005; Choi et al., 2009; Davies et al., 2010; Eng et al., 2010). Não observamos diferença estatística entre os sexos dos pacientes dos grupos benigno e maligno (p=0,584), em consonância com a literatura. Alguns autores acreditam que indivíduos do sexo masculino apresentam risco 2 a 3 vezes maior para malignidade no nódulo da tireoide, devendo ser seguidos com mais cautela

(Ross DS, 2003; Lansford et al., 2006), em contraste com os dados obtidos nesse estudo.

O achado de metástase linfonodal está diretamente relacionado à sua procura ativa através da USG cervical pré-operatória ou durante a cirurgia. Na maioria das vezes, a presença de metástase linfonodal é evidenciada apenas no seguimento do paciente com CDT. No Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC-FMUSP, o esvaziamento cervical eletivo, ou seja, a exérese das cadeias ganglionares cervicais no nível VI, não é feita rotineiramente. Neste estudo, a realização de TT+EC por indicação do cirurgião responsável foi feita em 27,7% (62/224) dos pacientes, ou seja, na presença de linfonodo à inspeção intra-operatória suspeita. Portanto, a interpretação da presença de metástase linfonodal foi prejudicada no nosso estudo.

O tamanho médio dos tumores do grupo maligno foi de 2,2 cm. Os dados histológicos de pior prognóstico, como multicentricidade, invasão capsular, vascular e linfática e a presença de metástase linfonodal foram avaliados.

Apesar de não termos encontrado uma diferença estatística entre os valores da dosagem sérica de TSH entre os grupos benignos e malignos, a literatura mostra que níveis séricos mais elevados de TSH podem se associar à elevação do risco de câncer de tireoide em pacientes com bócio nodular (Boelaert et al., 2006; Moon et al., 2010; Rago et al., 2010), e também associado a estágios mais avançados do câncer da tireoide. Desta maneira, o TSH desempenha um papel central no desenvolvimento e

progressão do câncer da tireoide (Haymart et al., 2008). Se analisarmos os valores de TSH relacionados ao maior aparecimento de câncer da tireóide, notamos valores estatisticamente mais altos associados ao câncer da tireoide, mas ainda dentro dos valores normais (TSH 1,40 a 4,99 mU/L vs TSH 0,4 a 1,39 mU/L) (Haymart et al. 2008). Excluindo os pacientes em tratamento com levotiroxina, continuamos a não observar diferença entre os grupos benigno e maligno. Estratificando os valores de TSH, ainda não observamos diferença entre os grupos. Provavelmente se aumentarmos a casuística, poderemos encontrar essa diferença.

Na maioria dos estudos retrospectivos relatados, observa-se uma tendência de correlação entre DAIT e câncer tireoidiano (Ott et al., 1987; Crile et al., 1978; Okayasu et al., 1995; Ott et al., 1985; Shih et al., 2008; Anil et al., 2010; Li et al., 2010). De acordo com as recomendações da American Thyroid Association (ATA) para nódulos da tireoide, existe a possibilidade de maior taxa de malignidade em nódulos tireoidianos envolvidos com tireoidite de Hashimoto (Crile et al., 1978; Cooper et a.l, 2009). Anil e cols. (Anil et al., 2010) demonstraram malignidade de 1% no grupo com tireoidite de Hashimoto (2/191 nódulos) vs. 2,7% no grupo controle (19/713), sem significado estatístico. Os consensos atuais recomendam a dosagem sérica de anticorpos anti-TPO e anti-TG apenas nos casos em que haja elevação do TSH na primeira investigação (Maia et al., 2007; Cooper et al., 2009; Eng et al., 2010). No presente estudo, a análise de DAIT por marcadores séricos não obteve diferença entre os grupos benignos e malignos (23,6% vs 19,6%, respectivamente para anti-TPO). Dos pacientes com CDT, 16,5% (16/97)

apresentaram dosagem de anti-TG positiva no pré-operatório. As diretrizes não comentam a respeito desta dosagem na avaliação pré-operatória. Acreditamos ser de extrema importância essa avaliação, pois fornece ao clínico que o seguimento do paciente não poderá ser feito pela dosagem de tiroglobulina sérica, em decorrência da sua interferência laboratorial (Cooper et al.,2009; Spencer CA, 2011).

Os vários estudos na literatura demonstram resultados não consensuais, mas apontando para a mesma direção, em valorizar a avaliação pela USG dos nódulos tireoidianos para determinar as características sugestivas de malignidade (Frates et al., 2005; Bastin et al., 2009; Cooper et al. 2009; Eng et al., 2010; Lew et al., 2010; Moon et al., 2010).

De acordo com as diretrizes da ATA 2009, apenas os pacientes de alto risco, ou seja, história de câncer da tireoide em um ou mais parentes de primeiro grau, história de radiação externa ou exposição ionizante na infância; ou adolescência, hemitiroidectomia prévia com descoberta de câncer da tireoide e exame de 18FDG-PET positivo com nódulos > 5 mm e características ultrassonográficas suspeitas devem ser submetidos à PAAF. Na presença apenas de microcalcificações e alto risco, sugerem PAAF em nódulos > 1 cm. Nódulos sólidos e hipoecogênicos devem ser submetidos à PAAF quando > 1 cm (Cooper DS, 2009). Neste trabalho, os pacientes foram submetidos à PAAF-USG levando em consideração apenas as características ultrassonográficas sugestivas de malignidade e/ou tamanho > 1 cm, de acordo com as diretrizes brasileiras (Maia et al., 2007).

As características ultrassonográficas de malignidade, ou seja, nódulo sólido, hipoecogênico, com microcalcificação, sem halo e vascularização central podem ser encontradas em doença benigna. Em nosso estudo, nódulo sólido, com microcalcificações, ausência de halo e vascularização central foram em conjunto os preditores de malignidade (Chammas et al., 2005).

Observamos maior presença de microcalcificação nos nódulos malignos correspondentes a CPVC pela sua própria característica histológica de psamomas, visualizadas como microcalcificações na USG.

O diagnóstico citológico através da PAAF é o método mais sensível e específico para identificação de nódulos tireoidianos malignos. Em centros especializados, a sua acurácia diagnóstica aproxima-se dos 98%, com taxas de falsos positivos e falsos negativos, inferiores a 2% (Filetti et al., 2006). Porém o diagnóstico citológico das PAAFs varia significativamente de uma instituição para outra, dificultando o compartilhamento de dados clinicamente significativos. Com isso a classificação de Bethesda permite a uniformidade das informações compartilhadas por patologistas, clínicos e cirurgiões, proporcionando maior correlação entre risco de malignidade e resultado citológico apresentado, possibilitando a definição da conduta mais adequada. Na nossa casuística, realizamos a classificação dos diagnósticos citológicos com base no sistema de Bethesda.

O sistema Bethesda propõe que PAAF classe II, ou seja, benigno a chance de malignidade é de 0 a 3%, sugerindo apenas seguimento clínico.

Em nossa casuística, apenas 8 nódulos com citologia benigna foram operados e nenhum deles apresentou malignidade.

Todos os pacientes com nódulo com citologia maligna (classe VI) foram submetidos a TT, cujo diagnóstico histológico revelou CPT, compatível com a literatura (Cibas et al., 2009). A grande maioria apresentou a forma clássica do CPT (79%), sendo que outros diagnósticos de malignidade, como linfoma, carcinoma medular da tireóide, não foram analisados por não ser o escope deste trabalho.

A citologia classe V, suspeita para malignidade apresenta risco de 60 a 75% de malignidade. Em nossa avaliação, apenas 7 citologias pertencentes à classe V eram tumores benignos: bócio e apenas 1 caso de adenoma folicular, perfazendo um achado de 81% de malignidade, predominantemente de CPT. A prevalência maior de malignidade pode ser atribuída. A classe V pode compreender principalmente ao CPVF, que é difícil diferenciá-la da lesão folicular benigna, justificando os achados de bócio nesta classe diagnóstica. Entretanto, identificamos em nosso estudo menor frequência da CPVF nesta classe, provavelmente porque a variante clássica ainda é a mais prevalente entre o CPT.

Identificamos 35% de malignidade em nódulos com citologia classe IV, neoplasia folicular, pouco maior que a sugerida na literatura. A grande maioria tratou-se de proliferação hiperplásica de células foliculares em bócio adenomatoso (5/20) e adenoma folicular (8/20). Nesta categoria, carcinoma folicular foi identificado apenas em 1 caso, reforçando sua baixa prevalência.

Frente a um diagnóstico citológico indeterminado, sugere-se acrescentar marcadores moleculares para identificar ou afastar malignidade.

O emprego do seqüenciamento automático, PCR em tempo real, genotipagem de SNPs, *microarrays* e outros ensaios moleculares estão mais comuns em laboratórios de diagnóstico, e não apenas de pesquisa, pois apresentam uma alta sensibilidade, especificidade e flexibilidade para a realização de vários testes. Porém estes ensaios precisam de DNA de boa qualidade, estando diretamente ligado ao desempenho do ensaio. Para melhorar o desempenho e otimização dos ensaios, muitos *kits* foram desenvolvidos para substituir a extração manual do DNA. Normalmente estes kits são compostos por três etapas: lise celular química, mecânica ou enzimática, seguida da remoção de restos celulares ou impurezas e terminando com a recuperação do DNA, através de filtros de membrana em coluna com reagentes caotrópicos (Yang et al., 2011). Embora esses *kits* comerciais pareçam demonstrar um melhor desempenho que os protocolos manuais, estão sujeitos a problemas como entupimentos dos filtros, rendimento incompatível, entre outros que podem levar a perda do material.

O aumento da demanda na pesquisa e no diagnóstico molecular do câncer de tireoide, principalmente o CPT, torna fundamental o uso de um protocolo confiável para a obtenção de DNA a partir de amostra de PAAF. Portanto o aperfeiçoamento de técnicas de extração de DNA desse tipo de amostra, de forma a torná-las de execução mais simples e menor custo, facilitaria a utilização desse material em estudos retrospectivos e prospectivos. No nosso estudo apresentamos os resultados da comparação

de dois protocolos de extração de amostras de lâminas citológicas de PAAF, PAAF a fresco e lavado da agulha de PAAF para a obtenção de DNA de boa qualidade. Realizamos o teste piloto levando em consideração as dificuldades que encontramos na nossa rotina laboratorial para a extração de DNA de amostras de PAAF utilizando o *kit* comercial QIAamp DNA Micro Kit e a seleção de 4 protolocos de extração anteriormente nunca usados para amostras de punção de nódulos tireoidianos (Poljak et al., 1995; Vince et al., 1998; Barea et al., 2004), mas que possuem como principal foco o material proveniente de fontes escassas. Com base neste teste, optamos por utilizar o *kit* comercial (protocolo 5), já muito utilizado e previamente descrito (Jo et al., 2009; Kim et al., 2010) para extração de DNA das amostras de PAAF a fresco e lavado da agulha de PAAF e o protocolo manual (protocolo 1) para as amostras de lâminas citológicas de PAAF, por ter apresentado os melhores resultados. Dos três tipos de amostras analisados, o DNA extraído das lâminas citológicas de PAAF foram as que apresentaram os melhores resultados. As lâminas apresentaram a maior concentração e qualidade de DNA, com menor custo por reação (em torno de 7 vezes mais barato). Além disso, na análise da mutação p.V600E do gene *BRAF* pela genotipagem, essas amostras apresentaram os melhores valores de intensidade de fluorescência (ΔRN).

Observamos que as amostras de lavado da agulha de PAAF não são ideais para serem utilizadas, pois apresentaram muito pouco material celular para a extração de DNA, podendo levar a um resultado falso negativo. As lâminas citológicas de PAAF se mostraram ideais, não só pelos dados

mostrados neste estudo, pois juntamente com a análise citológica por um patologista experiente, teremos a certeza de que o material utilizado nos ensaios moleculares é adequado, diminuindo dessa forma os resultados falsos negativos e falsos positivos.

Desta forma, a padronização de um protocolo de extração que seja rápido e apresente um alto desempenho pode contribuir juntamente com uma análise citológica para um diagnóstico molecular mais específico do CPT e suas variantes.

É importante acrescentar que 20% das PAAF com achados indeterminados e 10% das PAAF não diagnósticas são, em última instância, diagnosticados como malignos após a análise histológica (Filetti et al., 2006). Com isso muitos estudos tiveram o objetivo de investigar mutações de oncogenes e genes supressores tumorais para melhorar a acurácia do diagnóstico da PAAF. A alta prevalência de mutações do gene *BRAF* e a sua elevada especificidade (valor preditivo positivo: 100%) no CPT, bem como a facilidade da sua detecção a partir de DNA tumoral, tornaram-no o candidato ideal para melhorar a confiabilidade dos diagnósticos baseados na citologia aspirativa de nódulos tireoidianos (Puxeddu et al., 2008).

Em nosso estudo, identificamos a mutação p.V600E em 67,7% (69/102) dos pacientes com CPT, estando mais presente na variante clássica do CPT (70,3%) e na variante folicular (69,7%), consistente com o descrito previamente por Oler e cols. (Oler et al., 2009) e como em outros estudos (Nikiforova et al., 2003; Puxeddu et al., 2004; Trovisco et al., 2005). Para aprimorar o diagnóstico citológico das classes III, IV e V, a análise da

mutação p.V600E pode confirmar o diagnóstico de CPT em 16% até 42% dos casos (Rowe et al., 2006). Em nosso estudo, conseguimos confirmar o diagnóstico de CPT pela presença de mutação p.V600E em 23,3% (41/176) dos casos com citologia indeterminada, o que levaria à mudança do seguimento e da abordagem cirúrgica de lobectomia para TT (Lee et al., 2007; Li et al., 2011).

Não identificamos a mutação p.V600E no gene *BRAF* nos CF assim como no grupo benigno, como esperado. Confirmamos os achados obtidos nas amostras de PAAF dos nódulos avaliados dos grupos benigno e maligno através de seqüenciamento automático do material obtido do tecido nodular a fresco ou parafinado dos pacientes, confirmando em 100% os achados obtidos pela técnica de genotipagem por PCR em tempo real, estando de acordo com o descrito por Benlloch e cols. (Benlloch et al, 2006). Com isso, tanto o protocolo de extração como a genotipagem por PCR em tempo real mostraram-se métodos aplicáveis e confiáveis.

Aspectos clínicos e histológicos do CPT e a presença de metástase linfonodal estão relacionados a um comportamento mais agressivo do tumor. O mesmo ocorreria em relação à presença da mutação p.V600E. (Namba et al., 2003; Nikiforova et al., 2003; Xu et al., 2003; Kim et al., 2004; Puxeddu et al., 2004; Trovisco et al., 2005; Elisei et al., 2008; Ito et al., 2009; Xing et al., 2009; Rivera et al., 2010).

Não observamos diferença na frequência da mutação p.V600E em relação ao sexo, como observado na literatura (Puxeddu et al., 2004; Trovisco et al., 2005; Piana et al., 2010; Sobrinho-Simões et al., 2010).

Na nossa casuística encontramos uma correlação entre a mutação p.V600E e idade mais avançada dos pacientes (p=0,041), assim como descrito por Nikiforova e cols.(Nikiforova et al., 2004).

Em relação ao tamanho do nódulo, a situação é controversa. Jo e cols. (Jo et al., 2006), constataram que os CPT que apresentavam a mutação p.V600E, apresentavam maior dimensão, em oposição ao estudo de Xing e cols (Xing M, 2005), que sugeriu que o tamanho do nódulo dos CPT com a mutação era substancialmente reduzido em relação aqueles sem a mutação. Este último achado confirma a grande prevalência da mutação p.V600E mesmo em microcarcinomas papilíferos (Park et al., 2009). Em nossa casuística, não encontramos correlação entre a presença da mutação p.V600E e o tamanho do tumor, assim como o nosso objetivo não foi investigar microcarcinomas.

A presença da mutação p.V600E tem mostrado associação significativa com características clássicas de agressividade tumoral, como extensão extratireoidiana (Nikiforova et al., 2003; Rivera et al., 2010), invasão vascular (Elisei et al., 2008) e metástase linfonodal (Kim et al., 2004),sugerindo que a pesquisa de mutação em PAAF possa ser realizada para auxiliar no planejamento cirúrgico, como esvaziamento cervical profilático (Xing et al., 2009).

Em nossa casuística, não observamos correlação da presença da mutação p.V600E com as características histológicas de maior agressividade do CPT, assim como estudos prévios da literatura. Trovisco e cols. (Trovisco et al., 2005) estudaram 280 pacientes com lesões de tireoide

provenientes de diversos centros, incluindo nosso Serviço. A mutação p.V600E foi detectada exclusivamente no CPT com arquitetura papilífera clássica ou mista papilífera/folicular e microcarcinoma papilífero. Os autores não identificaram relação entre a ocorrência da mutação p.V600E e sinais clínicos de agressividade, como tamanho, invasão vascular, extensão extratireoidiana metástase linfonodal. A única diferença encontrada entre os casos com e sem a mutação p.V600E foi à maior frequência de lesões multicêntricas nos casos de CPT sem a mutação. Os autores concluem que a mutação p.V600E não parece conferir isoladamente um estímulo forte para o desenvolvimento de neoplasia na tireoide. Ressaltam que isso não significa que o CPT com mutação p.V600E não possa progredir para carcinoma pouco diferenciado como relatado na literatura (Nikiforovaet al., 2003; Puxeddu et al., 2004; Trovisco et al., 2005; Trovisco et al., 2008).

Talvez o número relativamente baixo de CPT que não apresentaram a mutação p.V600E pode ter enfraquecido o poder estatístico do estudo, assim como descrito por Kim e cols (Kim et al., 2006).

A ausência de relação entre a mutação p.V600E e achados histológicos de pior prognóstico também decorre da frequência elevada de CPT com excelente prognóstico (Rosai et al., 2003; Soares et al., 2011), mesmo com infiltração local e metástase linfonodal (Wada et al., 2003; Soares et al., 2009).

Basolo e cols. (Basolo et al., 2010) mostraram que, nos microcarcinomas papilíferos, há uma significativa associação entre a presença da mutação p.V600E e invasão tumoral e metástase ganglionar.

Essas descobertas são muito importantes do ponto de vista patológico e apoiam o papel oncogênico atribuído a ativação aberrante de vias de sinalização devido à presença da mutação p.V600E em linhagens de células (Mitsutake et al., 2005) e modelos animais (Franco et al., 2011). A questão da invasão tumoral é muito importante na maioria dos CPVC que apresentam contornos irregulares e no CPVF infiltrativo (Castro et al., 2002), sendo que ambos tendem a dar origem a metástases linfáticas, mesmo quando os tumores primários são muito pequenos (Wada et al., 2003). Resta esclarecer como a mutação p.V600E aumenta a capacidade de invasão das células tumorais.

Os dados sobre a presença da mutação p.V600E em linhagens celulares, modelos experimentais, bem como os dados observados em estudos clínico-patológicos, não provam que a mutação p.V600E, por si só é um importante fator prognóstico no CPT. Maior número de pacientes e acompanhamento a muito longo prazo, somando-se cuidadosa avaliação clínica-morfológica com a detecção de mutação p.V600E e utilizando análises multivariadas, são necessários para esclarecer o significado prognóstico independente desta mutação. Estudos semelhantes também são necessários para encontrar uma maneira de combinar as características clínicas e USG, com a detecção da mutação p.V600E no material da PAAF para decidir a melhor abordagem cirúrgica (Soares et al., 2011).

Compilando vários estudos que avaliaram um total de 1.153 amostras de PAAF, a análise da mutação p.V600E apresentou uma alta especificidade diagnóstica para a detecção de CPT, através de diferentes técnicas, tais

como RFLP, seqüenciamento automático, piroseqüenciamento, PCR em tempo real alelo-específico (Tabela 28) (Cohen et al, 2004; Salvatore et al, 2004; Xing et al, 2004; Domingues et al, 2005; Jin et al, 2006; Rowe et al, 2006; Pizzolanti et al, 2007; Sapio et al, 2007; Kim et al, 2008; Bentz et al, 2009; Jo et al, 2009; Marchetti et al, 2009; Nikiforov et al, 2009; Zatelli et al., 2009; Cantara et al, 2010; Nam et al, 2010; Ohori et al, 2010; Lee et al, 2012). Na literatura, já foram descritos 6 casos falso-positivos da mutação p.V600E. A primeira descrição foi feita por Chung e cols. (Chung et al., 2006), em um paciente com diagnóstico citológico indeterminado que apresentava a mutação p.V600E no material da PAAF, mas com um diagnóstico histológico de tireoidite de Hashimoto com hiperplasia atípica. Os autores especulam que a hiperplasia atípica poderia ter sido uma lesão precursora do CPT.

Com isso observamos que o método de PCR em tempo real, utilizando sondas TaqMan® foi uma forma sólida e conveniente para determinar a presença de mutação p.V600E, mostrando uma clara discriminação dos alelos a partir de pequenas quantidades de DNA (10 ng/µL). Além disso, apresentou vantagens em relação ao custo, tempo e trabalho, podendo ser considerada uma alternativa para o seqüenciamento automático, permitindo um fluxo de trabalho eficiente.

Os nossos resultados confirmam que esta abordagem melhorou significativamente a detecção de CPT, confirmando o VPP de 100%, como relatado por Nikiforov e cols. (Nikiforov et al., 2009), sugerindo que os

pacientes que apresentam a mutação p.V600E são candidatos a TT independentemente dos resultados citológicos.

Devido ao nosso critério de seleção, conseguimos obter uma alta sensibilidade e especificidade nos diagnósticos citológicos baseados na classificação de Bethesda (67,4% e 94,4% respectivamente). Nosso serviço está atualmente fornecendo o diagnóstico citológico adotado por Carneiro PC (Carneiro PC, 1988) juntamente com a classificação de Bethesda. Quando avaliamos a presença da mutação p.V600E isoladamente, observamos uma sensibilidade de 63,4% e alta especificidade (100%). Como a avaliação citológica deve ser sempre levada em consideração, quando adicionamos a presença da mutação, observamos uma especificidade de 94,4%. Da mesma forma, o VPP da análise da mutação p.V600E em conjunto com o diagnóstico citológico foi de 100%, corroborando com os dados da literatura (Nikiforova et al., 2003; Nikiforov et al., 2009). Por outro lado, o VPN da mutação V600E permanece elevado (Tabela 27), pois a mutação não é encontrada em todos os casos de CPT. Provavelmente serão necessários estudos de mais marcadores de CPT no diagnóstico citológico, como proposto por Nikiforov e cols. além do gene *BRAF*, como mutações no gene *RAS* e novos fatores envolvidos na oncogênese (Nikiforov et al., 2009; Li et al., 2011).

Tabela 28: Síntese dos trabalhos que avaliaram o gene *BRAF* em material de PAAF.

	País	Estudo	n° CPT (DH)	n° CPT (DC)	Genes Avaliados	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Bentz et al. 2009	EUA	Retrospectivo	40	22 CPT, 17 indeterminados, 1 benigno	*BRAF*	42,5%	100%	100%	17,9%
Cantara et al. 2010	Itália	Prospectivo	74	46 CPT, 7 indeterminados, 8 benignos, 13 inconclusivos	*BRAF*, RAS, RET, TKR,PPRγ*	44,6%	100%	100%	79,7%
Cohen et al. 2004	EUA	Retrospectivo	54	23 CPT, 29 indeterminados, 2 benignos	*BRAF*	32%	97,3%	98,7%	52,9%
Domingues et al. 2005	Portugal	Prospectivo	11	9 CPT, 1 indeterminado, 1 benigno	*BRAF*, RET/PTC*	27,3%	100%	100%	61,9%
Jin et al. 2006	EUA	Retrospectivo	58	57 CPT, 1 indeterminado	*BRAF*	53,5%	100%	100%	32,5%
Jo et al. 2009	Coréia	Prospectivo	40	30 CPT, 9 indeterminados, 1 inconclusivo	*BRAF*	75%	100%	100%	85,9%

Continuação da Tabela 28.

	País	Estudo	n° CPT (DH)	n° CPT (DC)	Genes Avaliados	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Kim et al. 2008	Coréia	Retrospectivo	75	57 CPT, 18 indeterminados	BRAF	84%	100%	100%	70%
Marchetti et al. 2009	Itália	Retrospectivo	90	56 CPT, 33 indeterminados, 1 benigno	BRAF	65,6%	100%	100%	40,4%
Nam et al. 2010	Coréia	Prospectivo	85	68 CPT, 16 indeterminados, 1 benigno	BRAF	71,8%	100%	100%	86,9%
Nikiforov et al. 2009	EUA	Prospectivo	38	18 CPT, 17 indeterminados, 3 benignos	BRAF*, RAS, RET/PTC, PAX8/PPAR	47	100%	100%	70,6%
Ohori et al. 2010**	EUA	Prospectivo	20	20 indeterminados	BRAF*, RAS, RET/PTC, PAX8/PPAR	15	100%	100%	85,1%
Pizzolanti et al. 2007	Itália	Prospectivo	16	13 CPT, 3 indeterminados	BRAF*, RET/PTC	68,8	100%	100%	86,8%

Continuação da Tabela 28.

	País	Estudo	n° CPT (DH)	n° CPT (DC)	Genes Avaliados	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Rowe et al. 2006	EUA	Retrospectivo	19	19 indeterminados	BRAF	15,8%	100%	100%	23,8%
Salvatore et al. 2004	Itália	Retrospectivo	69	54 CPT, 11 indeterminados, 4 inconclusivos	BRAF*, RET/PTC	37,7%	100%	100%	38,6%
Sapio et al. 2007**	Itália	Prospectivo	21	21 indeterminados	BRAF*, Galectina 3	47,6%	100%	100%	91,8%
Xing et al. 2004	EUA	Prospectivo	16	10 CPT, 6 indeterminados	BRAF	50%	99,7%	97,9%	78,4%
Zatelli et al. 2009	Itália	Prospectivo	74	45 CPT, 23 indeterminados, 6 benignos	BRAF	63,5%	98,8%	99,6%	93,6%

*resultados referentes à análise do gene BRAF; **Nestes estudos foram excluídos os pacientes com diagnóstico citológico de CPT. PAAF: punção aspirativa com agulha fina; DH: diagnóstico histológico; DC: diagnóstico citológico; VPN: valor preditivo negativo; VPP: valor preditivo positivo.

CONCLUSÃO

Realizamos a padronização de um protocolo de extração de DNA a partir de lâminas citológicas de PAAFs que apresentou alto desempenho, contribuindo para o diagnóstico molecular mais específico do CPT e suas variantes.

A técnica de genotipagem por PCR em tempo real apresentou melhor eficiência e relação custo-tempo em comparação ao seqüenciamento automático, com reprodutibilidade de 100%.

Identificamos a presença da mutação p.V600E do gene *BRAF* em material de PAAF-USG em 67,7% (69/102) dos pacientes com CPT submetidos à tireoidectomia.

A presença da mutação p.V600E do gene *BRAF* não mostrou associação com características clínicas e histopatológicas de maior agressividade em nossa casuística.

A sensibilidade, especificidade e acurácia do diagnóstico citológico em conjunto com a análise molecular da mutação p.V600E do gene *BRAF* em material de PAAF melhorou significativamente todos os parâmetros analisados.

REFERENCIAS

Anil C, Goksel S, Gursoy A. Hashimoto's thyroiditis is not associated with increased risk of thyroid cancer in patients with thyroid nodules: a single-center prospective study. Thyroid. 2010 Jun;20(6):601-6.

Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. Histopathology. 2002 Oct;41(4):357-62.

Baier ND, Hahn PF, Gervais DA, Samir A, Halpern EF, Mueller PR, Harisinghani MG. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: experience in a cohort of 944 patients. AJR Am J Roentgenol. 2009 Oct;193(4):1175-9.

Barea JA, Pardino MIMC, Gusshiken T. Methods of DNA extraction from archived materials and rare sources for utilization in polymer chain reaction. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2004, vol.26, n.4, pp. 274-281. ISSN 1516-8484.

Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M, Lupi C, Sensi E, Berti P, Elisei R, Vitti P, Baggiani A, Miccoli P. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Sep;95(9):4197-205.

Bastin S, Bolland MJ, Croxson MS. Role of ultrasound in the assessment of nodular thyroid disease. J Med Imaging Radiat Oncol. 2009 Apr;53(2):177-87.

Belfiore A, La Rosa GL. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. Endocrinol Metab Clin North Am. 2001 Jun;30(2):361-400.

Benlloch S, Payá A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R, Castells A, Llor X, Aranda FI, Massutí B. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. J Mol Diagn. 2006 Nov;8(5):540-3.

Bentz BG, Miller BT, Holden JA, Rowe LR, Bentz JS. B-RAF V600E mutational analysis of fine needle aspirates correlates with diagnosis of thyroid nodules. Otolaryngol Head Neck Surg. 2009 May;140(5):709-14.

Boelaert K, Horacek J, Holder RL, Watkinson JC, Sheppard MC, Franklyn JA. Serum thyrotropin concentration as a novel predictor of malignancy in thyroid nodules investigated by fine-needle aspiration. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Nov;91(11):4295-301. Epub 2006 Jul 25.

Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, Saberi-Firoozi M, Al-Mandhari M, Al-Mawaly K, Al-Mjeni R, Al-Sayegh A, Raeburn S, Lee E, Giardiello F, Smoot DT, Vilkin A, Boland CR, Goel A, Hafezi M, Nouraie M, Ashktorab H. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study. Mol Cancer. 2008 Aug 21;7:68.

Cady B. Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition. Surg Oncol Clin N Am. 1998 Oct;7(4):633-44.

Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, Di Santo A, Caruso G, Carli AF, Brilli L, Montanaro A, Pacini F. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Mar;95(3):1365-9.

Cantisani V, Catania A, De Antoni E, Greco R, Caruso R, Di Segni M, Medvedyeva E, Maldur V, Guerrisi I, Kyriacou KA, Passariello R, Carbotta G, Giusti DM, Guaitoli E, Garkavaya T, Olive M, Ricci P, D'Andrea V. Is pattern III as evidenced by US color-Doppler useful in predicting thyroid nodule malignancy? Large-scale retrospective analysis. Clin Ter. 2010;161(2):e49-52.

Carneiro PC. Contribuição ao método de biópsia aspirativa por agulha fina de tireóide. [Tese de Doutorado]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1988.

Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avenia N, Cavaliere A, Monacelli M, Macchiarulo A, Santeusanio F, Tartaglia M, Puxeddu E. Genotyping of an

Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). Clin Endocrinol (Oxf). 2006 Jan;64(1):105-9.

Castro P, Fonseca E, Magalhães J, Sobrinho-Simões M. Follicular, papillary, and "hybrid" carcinomas of the thyroid. Endocr Pathol. 2002 Winter; 13(4):313-20.

Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Jan;91(1):213-20.

Chammas MC, Gerhard R, de Oliveira IR, Widman A, de Barros N, Durazzo M, Ferraz A, Cerri GG. Thyroid nodules: evaluation with power Doppler and duplex Doppler ultrasound. Otolaryngol Head Neck Surg. 2005 Jun;132(6):874-82.

Choi YJ, Yun JS, Kim DH. Clinical and ultrasound features of cytology diagnosed follicular neoplasm. Endocr J. 2009; 56(3):383-9.

Chong H, Guan KL. Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. J Biol Chem. 2003 Sep 19; 278(38): 36269-76.

Chow SM, Law SC, Mendenhall WM, Au SK, Yau S, Yuen KT, Law CC, Lau WH. Follicular thyroid carcinoma: prognostic factors and the role of radioiodine. Cancer. 2002 Aug 1;95(3):488-98.

Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, Park do J, Lee HS, Cho BY, Lee ES, Kim SW. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. Clin Endocrinol (Oxf). 2006 Nov;65(5):660-6.

Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. Endocr Pathol. 2005 Fall;16(3):163-72.

Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Thyroid. 2009 Nov;19(11):1159-65.

Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro AP, Vaisman M. Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2005 Aug;49(4):503-9.

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.

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.

Cox MR, Marshall SG, Spence RA. Solitary thyroid nodule: a prospective evaluation of nuclear scanning and ultrasonography. Br J Surg. 1991 Jan;78(1):90-3.

Crile G Jr. Struma lymphomatosa and carcinoma of the thyroid. Surg Gynecol Obstet. 1978 Sep;147(3):350-2.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA.

Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA. 2006 May 10;295(18):2164-7.

Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. Cancer. 2009 Aug 15;115(16):3801-7.

Dean DS, Hay ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. Cancer Control. 2000 May-Jun;7(3):229-39.

DeLellis R, Lloyd R, Heitz P, Eng C (editors). Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. 3rd ed. Lyon: WHO Classification of Tumours; 2004.

Domingues R, Mendonça E, Sobrinho L, Bugalho MJ. Searching for RET/PTC rearrangements and BRAF V599E mutation in thyroid aspirates might contribute to establish a preoperative diagnosis of papillary thyroid carcinoma. Cytopathology. 2005 Feb;16(1):27-31.

Drinkwater NR, Sugden B. Mecanismos da carcinogênese. In Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosch FX. Manual de Oncologia Clínica. 5º ed. São Paulo: Fundação Oncocentro; 1991. p. 7-21

Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. Physiol Rev. 1992 Jul;72(3):667-97.

Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P, Pinchera A, Pacini F. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Jul;86(7):3211-6.

Eng CY, Quraishi MS, Bradley PJ. Management of Thyroid nodules in adult patients. Head Neck Oncol. 2010 May 5;2:11.

Fagin JA. Minireview: branded from the start-distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid. Mol Endocrinol. 2002 May;16(5):903-11.

Feldt-Rasmussen U, Rasmussen AK. Autoimmunity in differentiated thyroid cancer: significance and related clinical problems. Hormones (Athens). 2010 Apr-Jun;9(2):109-17.

Filetti S, Durante C, Torlontano M. Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006 Jul;2(7):384-94.

Fiore E, Rago T, Provenzale MA, Scutari M, Ugolini C, Basolo F, Di Coscio G, Miccoli P, Grasso L, Pinchera A, Vitti P. L-thyroxine-treated patients with nodular goiter have lower serum TSH and lower frequency of papillary thyroid cancer: results of a cross-sectional study on 27.914 patients. Endocr Relat Cancer. 2010 Feb 18;17(1):231-9.

Franco C, Martínez V, Allamand JP, Medina F, Glasinovic A, Osorio M, Schachter D. Molecular markers in thyroid fine-needle aspiration biopsy: a prospective study. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2009 May;17(3):211-5.

Franco AT, Malaguarnera R, Refetoff S, Liao XH, Lundsmith E, Kimura S, Pritchard C, Marais R, Davies TF, Weinstein LS, Chen M, Rosen N, Ghossein R, Knauf JA, Fagin JA. Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 25;108(4):1615-20.

Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, Cronan JJ, Doubilet PM, Evans DB, Goellner JR, Hay ID, Hertzberg BS, Intenzo CM, Jeffrey RB, Langer JE, Larsen PR, Mandel SJ, Middleton WD, Reading CC, Sherman SI, Tessler FN; Society of Radiologists in Ultrasound. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in

Ultrasound consensus conference statement. Radiology. 2005 Dec;237(3):794-800.

Gabalec F, Cáp J, Ryska A, Vasátko T, Ceeová V. Benign fine-needle aspiration cytology of thyroid nodule: to repeat or not to repeat? Eur J Endocrinol. 2009 Dec;161(6):933-7. Epub 2009 Sep 23.

Gharib H, Papini E, Paschke R. Thyroid nodules: a review of current guidelines, practices, and prospects. Eur J Endocrinol. 2008 Nov;159(5):493-505. Epub 2008 Aug 26.

Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. Cancer. 1997 Feb 1;79(3):564-73.

Grant CS, Hay ID, Gough IR, Bergstralh EJ, Goellner JR, McConahey WM. Local recurrence in papillary thyroid carcinoma: is extent of surgical resection important? Surgery. 1988 Dec;104(6):954-62.

González-González A, Mate Valdezate A, Parra Arroyo A, Tenías Burillo JM. Diagnostic efficiency of sonographic findings of thyroid nodules in the detection of malignancy. Endocrinol Nutr. 2010 Jun-Jul;57(6):240-4.

Gupta M, Gupta S, Gupta VB. Correlation of fine needle aspiration cytology with histopathology in the diagnosis of solitary thyroid nodule. J Thyroid Res. 2010 Apr 18;2010:379051.

Hadjieva T. Scoring patients' risk in differentiated thyroid cancer. Onkologie. Onkologie. 2001 Dec;24(6):561-8.

Hay R, MacRae E, Barber D, Khalil M, Demetrick DJ. BRAF mutations in melanocytic lesions and papillary thyroid carcinoma samples identified using melting curve analysis of polymerase chain reaction products. Arch Pathol Lab Med. 2007 Sep;131(9):1361-7.

Haymart MR, Repplinger DJ, Leverson GE, Elson DF, Sippel RS, Jaume JC, Chen H. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with greater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Mar;93(3):809-14.

Hegedüs L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. Endocr Rev. 2003 Feb;24(1):102-32.

Hegedus L. Clinical practice. The thyroid nodule. N Engl J Med. 2004 Oct 21;351(17):1764-71.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY). 1992 Apr;10(4):413-7.

Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. 2a. ed. New York: Wiley. 2000, 320p.

Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. Cell Cycle. 2007 Feb 1;6(3):377-9.

Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. Cancer. 1998 Dec 15;83(12):2638-48.

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;56(1):89-97. Epub 2008 Oct 8.

Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin. 2003 Jan-Feb;53(1):5-26.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin. 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.

Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, Qian X, Oliveira A, Majerus JA, Johnson MR, Lloyd RV. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. Diagn Mol Pathol. 2006 Sep;15(3):136-43.

Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, Lee HJ, Sul JY, Kweon GR, Ro HK, Kim JM, Shong M. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Sep;91(9):3667-70.

Jo YS, Huang S, Kim YJ, Lee IS, Kim SS, Kim JR, Oh T, Moon Y, An S, Ro HK, Kim JM, Shong M. Diagnostic value of pyrosequencing for the BRAF V600E mutation in ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy samples of thyroid incidentalomas. Clin Endocrinol (Oxf). 2009 Jan;70(1):139-44.

Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. Yonsei Med J. 2004 Oct 31;45(5):818-21.

Kim SK, Kim DL, Han HS, Kim WS, Kim SJ, Moon WJ, Oh SY, Hwang TS. Pyrosequencing analysis for detection of a BRAFV600E mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. Diagn Mol Pathol. 2008 Jun;17(2):118-25.

Kim SW, Lee JI, Kim JW, Ki CS, Oh YL, Choi YL, Shin JH, Kim HK, Jang HW, Chung JH. BRAFV600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Aug;95(8):3693-700.

Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2005 Nov;63(5):588-93.

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.

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.

Kirkwood BR,.Sterne JAC. Essential medical statistics. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. 2006, p.502.

Kitamura Y, Shimizu K, Nagahama M, Sugino K, Ozaki O, Mimura T, Ito K, Ito K, Tanaka S. Immediate causes of death in thyroid carcinoma: clinicopathological analysis of 161 fatal cases. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Nov;84(11):4043-9.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. Nat Rev Cancer. 2006 Apr;6(4):292-306.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125. Epub 2006 Feb 3.

Kumar A, Shah DH, Shrihari U, Dandekar SR, Vijayan U, Sharma SM. Significance of antithyroglobulin autoantibodies in differentiated thyroid carcinoma. Thyroid. 1994 Summer;4(2):199-202.

Kumar R, Angelini S, Hemminki K. Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. Oncogene. 2003 Dec 18;22(58):9217-24.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW,

Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 15;28(2):655-61.

Lansford CD, Teknos TN. Evaluation of the thyroid nodule. Cancer Control. 2006 Apr;13(2):89-98.

Lee EJ, Song KH, Kim DL, Jang YM, Hwang TS, Kim SK. The BRAF(V600E) mutation is associated with malignant ultrasonographic features in thyroid nodules. Clin Endocrinol (Oxf). 2011 Dec;75(6):844-50.

Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. Cancer. 2007 Jul 1;110(1):38-46.

Leenhardt L, Tramalloni J, Aurengo H, Delbot T, Guillausseau C, Aurengo A. Echography of thyroid nodules. The echography specialist facing the clinician's requirements. Presse Med. 1994 Oct 8;23(30):1389-92.

Lew JI, Rodgers SE, Solorzano CC. Developments in the use of ultrasound for thyroid cancer. Curr Opin Oncol. 2010 Jan;22(1):11-6.

Li H, Robinson KA, Anton B, Saldanha IJ, Ladenson PW. Cost-effectiveness of a novel molecular test for cytologically indeterminate thyroid nodules. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Nov;96(11):E1719-26.

Li QS, Chen SH, Xiong HH, Xu XH, Li ZZ, Guo GQ. Papillary thyroid carcinoma on sonography. Clin Imaging. 2010 Mar-Apr;34(2):121-6.

Li WB, Zhu QL, Zhang B, Jiang YX, Yang D. Ultrasound-guided fine needle aspiration in the diagnosis of thyroid nodule. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2010 Feb;32(1):76-80.

Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, Rosário PW, Vaisman M. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007 Jul;51(5):867-93.

Marchetti I, Lessi F, Mazzanti CM, Bertacca G, Elisei R, Coscio GD, Pinchera A, Bevilacqua G. A morpho-molecular diagnosis of papillary thyroid carcinoma: BRAF V600E detection as an important tool in preoperative evaluation of fine-needle aspirates. Thyroid. 2009 Aug;19(8):837-42.

Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JC, Ebina KN, Kimura ET. Biological markers in thyroid tumors. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004 Feb;48(1):114-25.

Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. Am J Med. 1994 Nov;97(5):418-28.

Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Apr;86(4):1447-63.

Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. Biochim Biophys Acta. 2003 Jun 5;1653(1):25-40.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215.

Mirallié E, Visset J, Sagan C, Hamy A, Le Bodic MF, Paineau J. Localization of cervical node metastasis of papillary thyroid carcinoma. World J Surg. 1999 Sep;23(9):970-3.

Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C Jr, Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. Cancer Res. 2005 Mar 15;65(6):2465-73.

Moon HJ, Kwak JY, Kim MJ, Son EJ, Kim EK. Can vascularity at power Doppler US help predict thyroid malignancy? Radiology. 2010 Apr;255(1):260-9.

Moretti S, Macchiarulo A, De Falco V, Avenia N, Barbi F, Carta C, Cavaliere A, Melillo RM, Passeri L, Santeusanio F, Tartaglia M, Santoro M, Puxeddu E. Biochemical and molecular characterization of the novel BRAF(V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. Oncogene. 2006 Jul 13;25(30):4235-40.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50.

Nam SY, Han BK, Ko EY, Kang SS, Hahn SY, Hwang JY, Nam MY, Kim JW, Chung JH, Oh YL, Shin JH. BRAF V600E mutation analysis of thyroid nodules needle aspirates in relation to their ultrasongraphic classification: a potential guide for selection of samples for molecular analysis. Thyroid. 2010 Mar;20(3):273-9.

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.

Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. Endocr Pathol. 2004 Winter;15(4):319-27.

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.

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.

Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, Thomas GA, Jeremiah S, Bogdanova TI, Tronko MD, Fagin JA, Nikiforov YE. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. Cancer Lett. 2004 Jun 8;209(1):1-6.

Nucera C, Goldfarb M, Hodin R, Parangi S. Role of B-Raf(V600E) in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-Raf(V600E). Biochim Biophys Acta. 2009 Apr;1795(2):152-61.

Okayasu I, Fujiwara M, Hara Y, Tanaka Y, Rose NR. Association of chronic lymphocytic thyroiditis and thyroid papillary carcinoma. A study of surgical cases among Japanese, and white and African Americans. Cancer. 1995 Dec 1;76(11):2312-8.

Oler G, Ebina KN, Michaluart P Jr, Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. Clin Endocrinol (Oxf). 2005 Apr;62(4):509-11.

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.

Ott RA, Calandra DB, McCall A, Shah KH, Lawrence AM, Paloyan E. The incidence of thyroid carcinoma in patients with Hashimoto's thyroiditis and solitary cold nodules. Surgery. 1985 Dec;98(6):1202-6.

Ott RA, McCall AR, McHenry C, Jarosz H, Armin A, Lawrence AM, Paloyan E. The incidence of thyroid carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. Am Surg. 1987 Aug;53(8):442-5.

Park YJ, Kim YA, Lee YJ, Kim SH, Park SY, Kim KW, Chung JK, Youn YK, Kim KH, Park do J, Cho BY. Papillary microcarcinoma in comparison with larger papillary thyroid carcinoma in BRAF(V600E) mutation, clinicopathological features, and immunohistochemical findings. Head Neck. 2010 Jan;32(1):38-45.

Piana S, Frasoldati A, Di Felice E, Gardini G, Tallini G, Rosai J. Encapsulated well-differentiated follicular-patterned thyroid carcinomas do not play a significant role in the fatality rates from thyroid carcinoma. Am J Surg Pathol. 2010 Jun;34(6):868-72.

Pizzolanti G, Russo L, Richiusa P, Bronte V, Nuara RB, Rodolico V, Amato MC, Smeraldi L, Sisto PS, Nucera M, Bommarito A, Citarrella R, Lo Coco R, Cabibi D, Lo Coco A, Frasca F, Gulotta G, Latteri MA, Modica G, Galluzzo A, Giordano C. Fine-needle aspiration molecular analysis for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma through BRAF V600E mutation and RET/PTC rearrangement. Thyroid. 2007 Nov;17(11):1109-15.

Poljak M, Barlic J, Seme K, Avsic-Zupanc T, Zore A. Isolation of DNA from archival Papanicolaou stained cytological smears using a simple salting-out procedure. Clin Mol Pathol. 1995 Feb;48(1):M55-6.

Poljak M, Seme K, Barlic J. Processing of long-stored archival Papanicolaou-stained cytological smears. Br J Cancer. 1996 Nov;74(9):1508-9.

Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, Namkoong J, Martino JJ, Koganti A, et al. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. Nat Genet. 2003 May;34(1):108-12

Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Rossi ED, Fadda G, Cavaliere A, Ribacchi R, Falorni A, Pontecorvi A, Pacini F, Pinchera A, Santeusanio F. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab. 2004 May;89(5):2414-20.

Puxeddu E, Durante C, Avenia N, Filetti S, Russo D. Clinical implications of BRAF mutation in thyroid carcinoma. Trends Endocrinol Metab. 2008 May-Jun;19(4):138-45.

Rago T, Fiore E, Scutari M, Santini F, Di Coscio G, Romani R, Piaggi P, Ugolini C, Basolo F, Miccoli P, Pinchera A, Vitti P. Male sex, single nodularity, and young age are associated with the risk of finding a papillary thyroid cancer on fine-needle aspiration cytology in a large series of patients with nodular thyroid disease. Eur J Endocrinol. 2010 Apr;162(4):763-70.

Rago T, Di Coscio G, Basolo F, Scutari M, Elisei R, Berti P, Miccoli P, Romani R, Faviana P, Pinchera A, Vitti P. Combined clinical, thyroid ultrasound and cytological features help to predict thyroid malignancy in follicular and Hupsilonrthle cell thyroid lesions: results from a series of 505 consecutive patients. Clin Endocrinol (Oxf). 2007 Jan;66(1):13-20.

Reddi HV, McIver B, Grebe SK, Eberhardt NL. The paired box-8/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma oncogene in thyroid tumorigenesis. Endocrinology. 2007 Mar;148(3):932-5.

Ribeiro ACMM. Avaliação do padrão de crescimento na sindrome de Noonan em pacientes com mutações identificadas nos genes PTPN11, SOS1, RAF1 e KRAS. [Tese de Doutorado]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

Rivera M, Ricarte-Filho J, Tuttle RM, Ganly I, Shaha A, Knauf J, Fagin J, Ghossein R. Molecular, morphologic, and outcome analysis of thyroid carcinomas according to degree of extrathyroid extension. Thyroid. 2010 Oct;20(10):1085-93.

Ronga G, Filesi M, Montesano T, Melacrinis FF, Di Nicola A, Ventroni G, Antonaci A, Vestri AR. Death from differentiated thyroid carcinoma: retrospective study of a 40-year investigation. Cancer Biother Radiopharm. 2002 Oct;17(5):507-14.

Rosário PW, Salles DS, Bessa B, Purisch S. Contribution of scintigraphy and ultrasonography to the prediction of malignancy in thyroid nodules with indeterminate cytology. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010 Feb;54(1):56-9.

Rosai J, LiVolsi VA, Sobrinho-Simoes M, Williams ED. Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. Int J Surg Pathol. 2003 Oct;11(4):249-51.

Ross DS. Evaluation and nonsurgical management of thyroid nodule. Randolph Surgery of the thyroid and parathyroid glands. Saunders 2003.

Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. Cytojournal. 2006 Apr 10;3:10.

Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, Nikiforov YE, Troncone G, Palombini L, Basolo F, Santoro M. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Oct;89(10):5175-80.

Sapio MR, Guerra A, Posca D, Limone PP, Deandrea M, Motta M, Troncone G, Caleo A, Vallefuoco P, Rossi G, Fenzi G, Vitale M. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. Endocr Relat Cancer. 2007 Dec;14(4):1089-97.

Sato N, Oyamatsu M, Koyama Y, Emura I, Tamiya Y, Hatakeyama K. Do the level of nodal disease according to the TNM classification and the number of involved cervical nodes reflect prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland? J Surg Oncol. 1998 Nov;69(3):151-5.

Schlumberger MJ. Diagnostic follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma: historical perspective and current status. J Endocrinol Invest. 1999;22(11 Suppl):3-7.

Schlumberger MJ, Torlantano M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2000 Dec;14(4):601-13.

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.

Shaha AR. Thyroid carcinoma: implications of prognostic factors. Cancer. 1998 Aug 1;83(3):401-2; discussion 403-4.

Shih ML, Lee JA, Hsieh CB, Yu JC, Liu HD, Kebebew E, Clark OH, Duh QY. Thyroidectomy for Hashimoto's thyroiditis: complications and associated cancers. Thyroid. 2008 Jul;18(7):729-34.

Shoup M, Stojadinovic A, Nissan A, Ghossein RA, Freedman S, Brennan MF, Shah JP, Shaha AR. Prognostic indicators of outcomes in patients with distant metastases from differentiated thyroid carcinoma. J Am Coll Surg. 2003 Aug;197(2):191-7.

Soares P, Sobrinho-Simões M. Is BRAF mutation screening useful for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer? Future Oncol. 2009 Oct;5(8):1225-9.

Sobrinho-Simões M, Eloy C, Vinagre J, Soares P. Molecular pathology of thyroid tumors: diagnostic and prognostic relevance. nt J Surg Pathol. 2010 Jun;18(3 Suppl):209S-212S.

Soares P, Sobrinho-Simões M. Cancer: Small papillary thyroid cancers--is BRAF of prognostic value? Nat Rev Endocrinol. 2011 Jan;7(1):9-10.

Souza SL, Montalli Da Assumpção LV, Ward LS. Impact of previous thyroid autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer. Thyroid. 2003 May;13(5):491-5.

Spencer CA. Clinical review: Clinical utility of thyroglobulin antibody (TgAb) measurements for patients with differentiated thyroid cancers (DTC). J Clin Endocrinol Metab. 2011 Dec;96(12):3615-27.

Stang MT, Carty SE. Recent developments in predicting thyroid malignancy. Curr Opin Oncol. 2009; 21: 11-7

Tanaka K, Sonoo H, Hirono M, Ohkubo S, Nomura T, Ikeda M, Nakajima K, Kurebayashi J. Retrospective analysis of predictive factors for recurrence after curatively resected papillary thyroid carcinoma. Surg Today. 2005;35(9):714-9.

Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. J Chin Med Assoc. 2010 Mar;73(3):113-28.

Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Máximo V, Silva P, Magalhães J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simões M. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. J Pathol. 2004 Feb;202(2):247-51.

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.

Trovisco V, Couto JP, Cameselle-Teijeiro J, de Castro IV, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M. Acquisition of BRAF gene mutations is not a requirement for nodal metastasis of papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2008 Oct;69(4):683-5.

Tysome JR, Chandra A, Chang F, Puwanarajah P, Elliott M, Caroll P, Powrie J, Hubbard JG, Clarke SE, Jeannon JP, Simo R. Improving prediction of malignancy of cytologically indeterminate thyroid nodules. Br J Surg. 2009 Dec;96(12):1400-5.

Ugolini C, Giannini R, Lupi C, Salvatore G, Miccoli P, Proietti A, Elisei R, Santoro M, Basolo F. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. Thyroid. 2007 May;17(5):381-8.

Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. Br J Haematol. 1998 May;101(2):349-51.

Xing M, Tufano RP, Tufaro AP, Basaria S, Ewertz M, Rosenbaum E, Byrne PJ, Wang J, Sidransky D, Ladenson PW. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2867-72.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr Relat Cancer. 2005 Jun;12(2):245-62. Review.

Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. Endocr Rev. 2007 Dec;28(7):742-62.

Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, Kim M, Tufaro A, Ladenson P, Zeiger M, Tufano R. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. J Clin Oncol. 2009 Jun 20;27(18):2977-82.

Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. Cancer Res. 2003 Aug 1;63(15):4561-7.

Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S, Frigato G, Buratto M, Tagliati F, Rossi R, Cavazzini L, Roti E, degli Uberti EC. BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsies. Eur J Endocrinol. 2009 Sep;161(3):467-73. Epub 2009 Jul 2.

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.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell. 2004 Mar 19;116(6):855-67.

Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Mol Aspects Med. 2006 Apr-Jun;27(2-3):254-98.

Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. Cancer. 2002 May 1;94(9):2511-6.