INÊS VIEIRA DE CASTRO

**Oxifilia nas lesões nodulares da tireóide:
classificação e relação com marcadores imuno-
histoquímicos e mutações nos genes BRAF e
RAS e rearranjo PAX8-PPARg**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Castro, Inês Vieira de

Oxifilia nas lesões nodulares da tireóide: classificação e relação com marcadores imuno-histoquímicos e mutações no genes BRAF e RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ / Inês Vieira de Castro. – São Paulo, 2006.

Tese (doutorado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1. Células de Hurthle 2. Glândula tireóide 3. Imuno-histoquímica
4. Biologia molecular/classificação 5. Mutação

USP/Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/SBD-164/06

Aos meus pais, **Maria Auxiliadora e José Maria**
Pelo estímulo e apoio incondicional

Ao meu marido **Hamilton,**
Pelo tempo cedido e compreensão

À minha filha **Isabella,**
Pela alegria e nova energia

Em homenagem póstuma ao **Professor Luiz Carlos da Costa Gayotto,**
Orientador que iniciou comigo a tese mas não pôde vê-la terminada,
Presente até o fim com seu estilo de trabalho e espírito científico

Em homenagem ao **Professor Manuel Sobrinho-Simões,**
Meu mestre em patologia da tireóide

Agradecimentos

Ao professor **Venâncio Avancini Ferreira Alves**, orientador e amigo que prontamente se dispôs a me ajudar a concluir a tese. Sempre interessado e preciso em suas sugestões e comentários, soube me estimular e tranquilizar nos momentos certos até o fim da pesquisa.

Ao professor **Manuel Sobrinho-Simões**, especialista mundialmente reconhecido em patologia da tireóide, pelo apoio na elaboração na tese, pelo suporte para a realização dos estudos de biologia molecular, pela participação nas publicações científicas e pela amizade.

Ao **Grupo de Patologia da Tireóide** do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), especialmente Paula Soares, Patrícia Castro e Vítor Trovisco, pela realização dos estudos de biologia molecular e participação nas publicações.

Aos **funcionários da Divisão de Anatomia Patológica** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração no levantamento dos casos do arquivo.

À responsável pelo setor de imuno-histoquímica do instituto Adolfo Lutz, **Cristina Kanamura**, pela padronização e realização das reações.

Ao sr. **Antônio Bruni**, pela análise estatística.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desta tese.

Esta tese está de acordo com:

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 A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Células de Hürthle e alterações mitocondriais.....	3
1.2. Patologia molecular dos nódulos da tireóide.....	10
1.3. Aspectos morfológicos e moleculares da classificação de tumores da tireóide, OMS / 2004.....	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. MÉTODOS.....	21
3.1. Seleção dos casos e revisão morfológica.....	22
3.2. Exame imuno-histoquímico.....	24
3.3. Pesquisa de mutações nos genes RAS e BRAF e rearranjo PAX8- PPAR γ	26
3.4. Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Revisão morfológica de acordo com a nova classificação OMS/2004, com ênfase no grau de oxifilia.....	32
4.2. Relação entre graus de oxifilia e variáveis clínico-patológicas.....	45
4.3. Mutações no gene BRAF e dados clínico-patológicos.....	47
4.4. Mutações no gene RAS e dados clínico-patológicos.....	49
4.5. Rearranjo PAX8-PPAR γ e dados clínico-patológicos.....	52
5. DISCUSSÃO.....	56
5.1. Revisão morfológica de acordo com a classificação OMS/2004 e estudo imuno-histoquímico.....	57
5.2. Oxifilia e dados clínico-patológicos.....	62

5.3. Oxifilia e rearranjo PAX8-PPAR γ e mutações nos genes BRAF e RAS	63
6. CONCLUSÕES	71
7. ANEXOS	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICES	

Lista de abreviaturas

CO: citocromo-oxidase

DN: distribuição no nódulo

DT: distribuição na tireóide

FISH: fluorescent in situ hybridization (hibridização *in situ* fluorescente)

H&E: hematoxilina e eosina

HIF-1: hypoxia inducible factor-1 (fator-1 indutível por hipóxia)

IN: intensidade no nódulo

IT: intensidade na tireóide

NR: não realizado

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia de polimerase)

ROS: reactive oxygen specimens (espécies reativas de oxigênio)

RT-PCR: *real time polymerase chain reaction* (reação em cadeia de polimerase em tempo real)

SSCP (*single strand conformation polymorphism*): eletroforese para estudo de polimorfismo de conformação em fita simples

TFPIM: tumor folicular de potencial incerto de malignidade

Lista de figuras

Figura 1 -	Oxifilia clássica e diagnóstico histológico (número de casos e porcentagem entre parênteses).....	32
Figura 2 -	Oxifilia parcial e diagnóstico histológico (número de casos e porcentagem entre parênteses).....	33
Figura 3 -	Oxifilia ausente e diagnóstico histológico (número de casos e porcentagem entre parênteses).....	33
Figura 4 -	Oxifilia e diagnóstico histológico nas lesões benignas e de potencial incerto de malignidade e nos carcinomas bem diferenciados.....	34
Figura 5 -	Imunorreatividade intensa (+++++) para CK19 em carcinoma papilífero Warthin-like – caso 17-6116-1 (400x).....	38
Figura 6 -	Imunorreatividade fraca (++) para CK19 em carcinoma folicular convencional minimamente invasivo – caso 45-6879-6 (400x).....	38
Figura 7a -	Imunorreatividade focal e fraca (++) para CK19 em bócio adenomatoso - caso 17-5300-2 (400X).....	39
Figura 7b -	Mesmo caso (17-5300-2), H&E (400X).....	39
Figura 8a -	Imunorreatividade intensa para citocromo-oxidase (+++++) em adenoma folicular oncocítico - caso 16-8354-3 (400x).....	42
Figura 8b -	Mesmo caso (16-8354-3), H&E (400x).....	42
Figura 9a -	Imunorreatividade intensa para citocromo-oxidase (++++) em carcinoma papilífero Warthin-like - caso 51-2601-0 (400x).....	43
Figura 9b -	Mesmo caso (51-2601-0), H&E (400x).....	43
Figura 10a -	Imunorreatividade fraca para citocromo-oxidase (++++) em adenoma folicular convencional - caso 36-0353-9 (400x).....	44
Figura 10b -	Mesmo caso (36-0353-9), H&E (400x).....	44
Figura 11 -	Imunorreatividade intensa (++++) focal para citocromo-oxidase em área de tireoidite crônica linfocitária - caso 47-0537-8 (400X)	45
Figura 12 -	Mutação no gene BRAF: eletroforese (SSCP) à esquerda; sequenciamento à direita.....	48

Figura 13 -	Mutação do gene RAS (N-RAS): a) eletroforese (SSCP); b) sequenciamento.....	52
Figura 14 -	<i>FISH</i> : Núcleos sem rearranjo PAX8-PPAR γ (esquerda) e com (direita), indicado por seta.....	53

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Diagnóstico histológico e oxifilia.....	24
Tabela 2 -	<i>Primers</i> e condições de PCR e SSCP.....	29
Tabela 3 -	Imuno-expressão da citoqueratina 19 de acordo com o diagnóstico histológico e oxifilia.....	37
Tabela 4 -	Imuno-expressão da citocromo-oxidase de acordo com o diagnóstico histológico e oxifilia.....	41
Tabela 5 -	Carcinoma papilífero: correlação entre oxifilia e dados clínico-patológicos.....	46
Tabela 6 -	Carcinoma folicular e tumor folicular de potencial incerto de malignidade: correlação entre oxifilia e dados clínico-patológicos	47
Tabela 7 -	Relação entre diagnóstico histológico, oxifilia e mutações no gene BRAF (V600E) nos carcinomas papilíferos e foliculares e nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade.....	49
Tabela 8 -	Relação entre diagnóstico histológico, oxifilia e mutações no gene RAS nos carcinomas foliculares e nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade.....	50
Tabela 9 -	Comparação dos dados clínico-patológicos de carcinomas foliculares com e sem mutações no gene RAS.....	51
Tabela 10 -	Comparação dos dados clínico-patológicos de tumores foliculares de potencial incerto de malignidade com e sem mutações no gene RAS.....	51
Tabela 11 -	Relação entre diagnóstico histológico, oxifilia e rearranjo PAX8-PPAR γ nos carcinomas foliculares e nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade.....	54
Tabela 12 -	Comparação dos dados clínico-patológicos de carcinomas foliculares com e sem rearranjo PAX8-PPAR γ	55
Tabela 13 -	Comparação dos dados clínico-patológicos dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade com e sem rearranjo PAX8-PPAR γ	55

RESUMO

Castro IV. *Oxifilia nas lesões nodulares da tireóide: classificação e relação com marcadores imuno-histoquímicos e mutações nos genes BRAF e RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 122p

Uma série de 205 casos de lesões nodulares da tireóide foi revista morfológicamente de acordo com a nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004) e analisada quanto à imuno-expressão das citoqueratinas 14 (CK 14) e 19 (CK19) e de citocromo-oxidase. Especial ênfase foi dada à avaliação da oxifilia nos nódulos, valorizando não só a oxifilia clássica (mais de 75% de células oncocíticas), mas também o que aqui chamamos de oxifilia parcial, e ao diagnóstico dos “tumores foliculares de potencial incerto de malignidade”. Amostras parafinadas dissecadas de carcinomas foram analisados para mutações dos genes BRAF e RAS (H-RAS, K-RAS e N-RAS) mediante PCR, SSCP e seqüenciamento e para rearranjo dos genes PAX8-PPAR γ mediante FISH e RT-PCR. A oxifilia esteve presente, com frequência variável, em todos os subtipos de nódulos da tireóide, benignos e malignos: 20,7 a 69,7 % dos nódulos exibiram oxifilia clássica e 58,6 a 90,6 % oxifilia de qualquer intensidade (clássica ou parcial). A imuno-expressão de citocromo-oxidase mostrou-se associada ao achado morfológico de oxifilia, principalmente nos nódulos benignos e nos carcinomas foliculares. A CK 19 apresentou reatividade intensa apenas nos carcinoma papilíferos e em um caso de carcinoma folicular com áreas sugestivas de evolução para carcinoma pouco diferenciado. Houve associação significativa entre o diagnóstico de carcinoma papilífero e expressão de CK19 ($p < 0.001$), mas a associação entre oxifilia e expressão de CK 19 não foi significativa. Nos carcinomas papilíferos, a oxifilia ausente ou parcial associou-se a maior frequência de multicentricidade e a oxifilia clássica à maior idade média dos pacientes. A mutação do gene BRAF (V600E) esteve presente apenas nos carcinomas papilíferos e não teve influência nas variáveis clínico-patológicas. O rearranjo PAX8-PPAR γ teve incidência nas lesões foliculares oncocíticas (22,2%) bem superior à relatada na literatura. Associou-se a menor idade média dos pacientes e menor diâmetro tumoral nos carcinomas foliculares. A presença de mutações do RAS nas lesões foliculares associou-se significativamente com invasão capsular e oxifilia parcial. Todas os padrões de alterações moleculares, embora presentes, foram menos frequentes nos tumores oncocíticos. Nossos resultados evidenciam que a oxifilia é muito frequente em todos os subtipos de nódulos da tireóide, inclusive nos recém-descritos “tumores foliculares de potencial incerto de malignidade”. Merece destaque o fato de, nas lesões foliculares, a presença de oxifilia, especialmente em sua forma clássica, ter sido significativamente mais frequente nos carcinomas, seguidos dos “tumores foliculares de potencial incerto”, sendo menos prevalente nos adenomas foliculares. Embora a oxifilia tenha sido associada com menor frequência de mutações nos genes BRAF, RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ , a detecção de sua coexistência com estas mutações e a presença frequente de oxifilia em todos os tipos de nódulos da tireóide

favorecem o conceito de que a oxifilia e a tumorigênese possam ser eventos distintos, muitas vezes paralelos.

Descritores: células de Hurthle – glândula tireóide – imuno-histoquímica – biologia molecular – classificação – mutação

SUMMARY

Castro IV. *Oxyphilia in thyroid nodules: classification and relationship with immunohistochemical markers and mutations in BRAF and RAS genes and PAX8-PPAR γ rearrangement* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006. 122p

A series of 205 thyroid nodules was morphologically reviewed according to the new World Health Organization (WHO, 2004) classification and analyzed regarding the immunoexpression of cytokeratins 14 (CK14) and 19 (CK19) and mitochondrial enzyme cytochrome oxidase. Special emphasis was given to the oxyphilia evaluation in the nodules, concerning not only the classical oxyphilia (more than 75% of oncocyctic cells) but also the presence of smaller amounts of oncocyctic cells, named herein “partial oxyphilia”, and to the recently purposed diagnosis of “follicular tumours of unknown malignancy potential”. Dissected paraffin-embedded samples of carcinomas were screened for BRAF and RAS mutations (H-RAS, K-RAS and N-RAS) by PCR, SSCP and direct sequencing, whereas FISH and RT-PCR were used for assessment of PAX8-PPAR γ rearrangement. The oxyphilia was present, with heterogeneous frequency, in all subtypes of thyroid nodules: 20.7 to 69.7% of the nodules showed classical oxyphilia and 58.6 to 90.6% of them, oxyphilia of any intensity (classical or partial). The immunoexpression of cytochrome-oxidase was associated to the morphological finding of oxyphilia, especially in benign nodules and in follicular carcinomas. CK19 showed intense reactivity only in papillary carcinomas and in one case of follicular carcinoma with areas that could be already poorly differentiated. There was a significant association between the diagnosis of papillary carcinoma and CK 19 expression ($p < 0.001$), but the association between oxyphilia and CK 19 expression was not statistically significant. Papillary carcinomas without or with partial oxyphilia were associated to a higher frequency of multicentricity and those with classical oxyphilia to older mean ages of patients. The BRAF gene mutation (V600E) was present only in papillary carcinomas and had no influence on clinical-pathological variables. The PAX8-PPAR γ rearrangement rates in oncocyctic follicular lesions were higher than those previously reported. This rearrangement was associated to a younger mean age of patients and to smaller follicular carcinomas. The presence of RAS mutations in follicular lesions was significantly associated to capsular invasion and partial oxyphilia. All patterns of molecular alterations assessed herein, although present, were less frequent in oncocyctic tumours. Our study further demonstrates the prevalence of classical and partial oxyphilia within all subtypes of thyroid nodules, including the recently described “follicular tumours of unknown malignancy potential”. A remarkable finding is that, among follicular neoplasms, oxyphilia, especially in “classical pattern” was significantly more prevalent in carcinomas, intermediate in “follicular tumours of unknown malignancy potential” and less common in adenomas. The absence of a significative relationship between oxyphilia and malignancy in most nodules is noteworthy. However, an association between oxyphilia and malignancy was observed in follicular neoplasms. Although oxyphilia has been associated with a lower mutation frequency in BRAF and RAS genes and PAX8-

PPAR γ rearrangement, it can coexist with these mutations. This finding and the high prevalence of oxyphilia in all subtypes of thyroid nodules support the concept that oxyphilia and tumourigenesis can be distinct, and many times, parallel events.

Keywords: Hurthle cells – thyroid gland – immunohistochemistry – molecular biology - classification – mutation

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de nódulos na tireóide pode refletir condições clínicas que variam desde bócio adenomatoso até neoplasias malignas. A doença nodular da tireóide, termo que inclui nódulos únicos ou múltiplos, é muito freqüente na população e sua incidência e prevalência são dependentes de diversos fatores, como a idade dos pacientes, localização geográfica e o método empregado em sua detecção: palpação, ultra-sonografia ou autópsia (1). É identificada por suas manifestações clínicas em 3 a 5% da população adulta e encontrada em cerca de 50% das autópsias (2). Sua freqüência aumenta com a idade (3), sendo mais comum no sexo feminino (4). Em mulheres acima dos 40 anos, foram detectados nódulos em 35,3 % das pacientes submetidas a ultra-sonografia, em um estudo realizado no Brasil (5).

Nos últimos anos, houve em todo o mundo um aumento do número de nódulos detectados na população, especialmente em decorrência do aumento do número de exames de imagem do pescoço, principalmente ultra-som, evidenciando nódulos ainda sem manifestação clínica (1). Nos Estados Unidos, cerca de 5% dos adultos têm nódulos palpáveis na tireóide (3). Apesar de serem freqüentes os nódulos, apenas cerca de 5% deles correspondem a neoplasias malignas (1, 3). Em um estudo retrospectivo de 145.043 autópsias realizado no nosso meio por Bisi et al., foram encontrados nódulos em 5.030 casos (3,4%), sendo 91,62 % não neoplásicos (bócio adenomatoso em sua maioria) e 8,38% neoplásicos. Dos nódulos neoplásicos, 68,24% eram malignos, primários e metastáticos (6).

Dentre os nódulos neoplásicos, o grupo dos tumores de células de Hurthle destaca-se pelas controvérsias na literatura sobre sua etiopatogênese, potencial de malignidade, critérios diagnósticos, classificação e importância prognóstica, com mudanças significativas de conceitos nos últimos anos.

1.1. Células de Hürthle e alterações mitocondriais

As células de Hürthle, também conhecidas com células oxifílicas, oncocíticas ou de Askanazy, são células epiteliais de folículos tireoideanos caracterizadas pelo abundante citoplasma eosinofílico e granular. Este aspecto resulta do acúmulo de mitocôndrias com anormalidades morfológicas, funcionais e genéticas, decorrentes de mutações no DNA mitocondrial e no DNA nuclear que codifica enzimas mitocondriais (7-14). Estas células ocorrem nos nódulos da tireóide, na tireoidite de Hashimoto e na atrofia glandular do idoso (14). É importante lembrar que embora as células de Hürthle com origem no epitélio folicular sejam as células oxifílicas mais frequentes na tireóide, também os carcinomas medulares podem sofrer transformação oxifílica e entrar no diagnóstico diferencial das neoplasias oncocíticas da tireóide (11). As células de Hürthle em geral são grandes, poligonais, com núcleo grande apresentando pleomorfismo variável. As células nos carcinomas tendem a ser menores do que as dos adenomas, chegando até o padrão de células pequenas que é encontrado nos carcinomas pouco diferenciados de células de Hürthle (11, 15). As células que Karl Hürthle descreveu no cão eram provavelmente células C e não

células foliculares oncocíticas, mas a designação “células de Hürthle” persistiu na literatura para as células que foram na verdade descritas por Askanazy (16).

As mitocôndrias acumulam-se com o passar do tempo no citoplasma de células que não estão se dividindo ou o fazem lentamente, como as dos órgãos parenquimatosos (tireóide, paratireóide, rim, glândula salivar, supra-renal) e nas células de tumores endócrinos e neuroendócrinos. Células que se renovam com frequência, como as da pele e dos tratos aéreo e digestivo, não chegam a acumular maiores quantidades de mitocôndrias. O mesmo ocorre com neoplasias com alta atividade proliferativa. Talvez por este motivo a maioria das neoplasias oncocíticas é benigna ou de baixo grau de malignidade e tende a ocorrer em pacientes mais idosos (9, 14, 17). O tempo necessário para a célula adquirir um aspecto oncocítico pleno pode ser longo, passando por uma fase em que o aspecto é apenas oncocitóide (9, 18, 19).

Classicamente, quando mais de 75 % de um nódulo neoplásico da tireóide são formados por células de Hürthle, caracteriza-se uma neoplasia de células de Hürthle (7, 20). Para comprovação da oxifilia podem, adicionalmente, ser utilizados microscopia eletrônica e imuno-histoquímica (7, 12, 15, 16, 21-23), empregando-se anticorpos anti-citoqueratina 14 (CK 14) e anticorpos dirigidos contra componentes mitocondriais. O anticorpo anti-citocromo-oxidase faz parte deste último grupo de marcadores e, como as células de Hürthle apresentam altas concentrações de enzimas oxidativas (7, 24), pode se mostrar útil no estudo de células oncocíticas na tireóide (25). O aumento do número de mitocôndrias é acompanhado por um aumento da concentração de enzimas dos complexos respiratórios I (*NADH desidrogenase*), II (*succinato desidrogenase*), IV (*citocromo-c oxidase*) e V (*ATPase*) da cadeia

respiratória (26). Não há, no entanto, correlação positiva entre oxifilia e metabolismo celular: parece haver um defeito na produção de energia na células oncocíticas (24). As anormalidades mitocondriais podem levar a deficiência da atividade enzimática: a deficiência da citocromo-c oxidase, por exemplo, pode estar envolvida no bloqueio da apoptose observado nas células de Hürthle (25, 27).

Uma célula oncocítica chega a ter 4.000 a 5.000 mitocôndrias, em comparação com 30 em um eosinófilo ou 15000 em um oócito, a células humana normal com maior número de mitocôndrias (9, 11, 12, 19). O DNA mitocondrial é circular, relativamente pequeno (16 569 bp), com 1 000 a 10 000 cópias por célula. Contém 37 genes que codificam 13 polipeptídeos englobando várias subunidades dos complexos da cadeia respiratória, além de 22 RNA transportadores e 2 RNA ribossômicos utilizados na síntese de proteínas mitocondriais (28-30). Há também uma região não codificante, chamada *displacement-loop (D-loop)*, que contém sequências regulatórias que controlam a replicação e transcrição do DNA mitocondrial (30). Os complexos I a V da cadeia respiratória são codificados por uma combinação de DNA nuclear e mitocondrial, com exceção do complexo II, codificado apenas por genes nucleares. O complexo I (NADH desidrogenase) contém 43 subunidades, sete codificadas por genes mitocondriais (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6). Uma subunidade do complexo III (citocromo B), três do complexo IV (COI, II e III) e duas do complexo V (ATPase 6 e 8) também são codificadas por genes mitocondriais (31).

Acredita-se que a principal causa das mutações no DNA mitocondrial seja o dano oxidativo e que seja estrutural o motivo de haver uma região com maior incidência de deleção no DNA mitocondrial (29, 32). A proximidade do DNA

mitocondrial com as “espécies reativas de oxigênio” (*reactive oxygen specimens-ROS*) geradas pela fosforilação oxidativa, combinada com o fato do DNA mitocondrial não dispor dos mesmos mecanismos de proteção e reparo do DNA nuclear, tornam suas mutações até 17 vezes mais frequentes do que as do DNA nuclear (29, 30, 32). As mutações e deleções no DNA mitocondrial aumentam com a idade em certos órgãos, em paralelo com a diminuição da função bioenergética mitocondrial. Proteínas e lípides mitocondriais também são susceptíveis a dano oxidativo acumulativo durante o envelhecimento (32).

Células oncocíticas são tradicionalmente consideradas como tendo metabolismo ativo e altos níveis de enzimas oxidativas. Entretanto, isto não parece se correlacionar com funcionamento celular adequado e, pelo menos na tireóide, as células de Hürthle apresentam menor eficiência metabólica (8, 11). O funcionamento anormal das mitocôndrias parece funcionar como estímulo para sua proliferação e leva a um aumento compensatório do número destas organelas no citoplasma celular, possivelmente envolvendo também genes nucleares controladores do número de mitocôndrias. É interessante observar que a mitocôndria com mutações prolifera mais do que as normais, levando a um aumento progressivo das mitocôndrias anormais (8, 9, 11, 14, 33). Uma possibilidade é que as mutações levem a um aumento discreto nos níveis de *ROS*. Estas moléculas são tóxicas quando em alta concentração, mas altamente mitogênicas em baixos níveis (29, 30). Não se sabe se um decréscimo na renovação mitocondrial pode ter também um papel no seu acúmulo nas células oncocíticas (9, 32). Existe ainda a possibilidade das anormalidades das mitocôndrias bloquearem o processo de apoptose, aumentando a sobrevivência celular e facilitando o acúmulo mitocondrial citoplasmático (14, 32).

Mutações e deleções no DNA mitocondrial foram descritas em neoplasias gástricas, colo-retais, hepáticas, pancreáticas e ovarianas, carcinomas de células renais, tumores de células de Hürthle e tumores oncocíticos do rim e paratireóides (11, 28-30, 34, 35). A alteração do DNA mitocondrial mais típica nas células oncocíticas é a presença de uma grande deleção (4 977 pb, que corresponde a cerca de um terço do DNA total em cada cromossomo mitocondrial) (9, 25). Esta deleção é geralmente designada como “deleção comum” e está presente em células oncocíticas da tireoidite de Hashimoto e tumores oncocíticos da tireóide, assim como no tumor de Warthin das glândulas salivares (9, 14, 25, 32). Mutações pontuais nos genes mitocondriais que codificam as enzimas dos complexos I, II, IV e V da cadeia respiratória mitocondrial também ocorrem nos tumores oncocíticos da tireóide (8). Defeitos da citocromo-c oxidase e a deleção comum do DNA mitocondrial ocorrem frequentemente em células da tireoidite de Hashimoto e podem ocorrer no bócio adenomatoso e com o envelhecimento (11, 36). Na tireoidite o dano oxidativo à células folicular estaria relacionado com a resposta imune prolongada e produção de citocinas (11).

Não se sabe com certeza a relação entre as mutações mitocondriais e a tumorigênese (14, 31, 35). A biologia das mitocôndrias sugere a possibilidade de haver alguma relação: as mitocôndrias geram ROS, que são moléculas altamente mitogênicas e também mutagênicas para o DNA nuclear e mitocondrial, e desempenham também um papel importante na regulação da apoptose (28, 37). As hipóteses incluem atividade anti-apoptótica mediada pelas mitocôndrias anormais, aumentando a sobrevivência celular, e a formação de radicais livres, funcionando como um sinal de hipóxia e aumentando os níveis do fator-1 indutível por hipóxia (*hypoxia*

inducible factor-1 – HIF-1), relacionado com angiogênese e, possivelmente, com proliferação (14, 33). O aumento progressivo do número de mitocôndrias com mutações no citoplasma celular pode refletir uma vantagem replicativa do DNA mutante, um maior crescimento de células com certas mutações no DNA mitocondrial e/ou mesmo propriedades tumorigênicas das mutações no DNA mitocondrial (8).

Na ausência de fatores ambientais que afetem as células tumorais, como na tireoidite, foi proposto por Katoh et al. (38) um modelo para o aparecimento da oxifilia nos tumores de células de Hürthle. Estaria relacionada com mutações somáticas em um ou vários genes (mitocondriais ou nucleares) direta ou indiretamente relacionados com o número de mitocôndrias. O momento em que ocorrem a oncogênese e o aparecimento da oxifilia poderia levar a duas situações: (1) a “oxifilia primária”, com todas as células oncocíticas desde o início do tumor, devido a uma ou mais mutações somáticas anteriores à tumorigênese, no DNA mitocondrial ou no DNA nuclear que codifica enzimas mitocondriais; (2) a “oxifilia secundária”, em que parte das células neoplásicas torna-se oncocítica após o início do desenvolvimento da neoplasia, devido a alterações induzidas por dano oxidativo ou outras agressões ambientais (8, 9, 11, 38). A maior taxa de divisão das mitocôndrias com mutações e deleções leva a um aumento do número de mitocôndrias anormais na células oncocíticas e explica a tendência progressiva à homoplasma, quando todas as mitocôndrias da célula tornam-se anormais. Nas doenças neurodegenerativas com alterações mitocondriais e nos tumores oncocíticos há, portanto, uma tendência ao acúmulo progressivo das mitocôndrias anormais. A homoplasma ocorreria em duas etapas: seleção mitocondrial, levando à substituição

das mitocôndrias normais pelas formas mutantes, e crescimento clonal das células com mutações (11, 29). Este crescimento clonal estaria relacionado com uma vantagem seletiva das células com mutações no DNA mitocondrial ou com mutações no DNA nuclear associadas (11, 29). O achado de mutações do DNA mitocondrial em parte dos carcinomas papilíferos esporádicos favorece a hipótese de que estas mutações são eventos tardios, relacionados com a progressão e não com a iniciação tumoral (31). O próprio desenvolvimento tumoral pode aumentar a quantidade de ROS e levar a dano no DNA mitocondrial (8, 29). O encontro de mutações no DNA mitocondrial na tireóide adjacente aos tumores, mesmo em baixos níveis, sugere que estas mutações também podem preceder em alguns casos a transformação oxifílica (8, 10).

As mitocôndrias participam do mecanismo de iniciação da apoptose, através da abertura do canal da membrana interna da mitocôndria. O espaço da membrana interna da mitocôndria contém fatores relacionados com a morte celular, incluindo o citocromo-c, fator indutor da apoptose e formas latentes das caspases. A abertura deste canal na membrana mitocondrial e a morte celular podem ser iniciados por redução na produção de energia mitocondrial e aumento crônico no estresse oxidativo (11). A liberação da citocromo-c oxidase leva a uma cascata de ativação da caspase que culmina com a apoptose (39, 40). O fator indutor da apoptose participa de um outro caminho para a apoptose, independente da caspase mas também relacionado com as mitocôndrias (39, 40). Por outro lado, o fator anti-apoptótico bcl-2 localiza-se normalmente na membrana externa da mitocôndria e está diminuído ou ausente nas células de Hürthle, tumorais e da tireoidite de Hashimoto (11, 27, 41). Os tumores de células de Hürthle exibem biologicamente um bloqueio da apoptose. Este

pode facilitar o acúmulo progressivo de mitocôndrias anormais ao prolongar a sobrevivência celular, levando a uma mudança progressiva da heteroplasmia para a homoplasmia. Esta maior sobrevivência pode também contribuir para o possível pior prognóstico dos tumores de células de Hürthle (11).

Formas familiares de tumores benignos e malignos de células de Hürthle podem ser devidas a mutações germinativas no GRIM-19, um gene nuclear envolvido no metabolismo mitocondrial e apoptose (13). Sua menor expressão facilita o crescimento das células e reduz a possibilidade dela entrar em apoptose. A mutação no GRIM-19 pode predispor ao aparecimento de tumores oncocíticos, mas outras alterações relacionadas com a oncogênese (como o rearranjo RET/PTC ou mutações no gene BRAF nos carcinomas papilíferos) são necessárias para o desenvolvimento de um fenótipo maligno (9, 13).

1.2. Patologia molecular dos nódulos da tireóide

Nos últimos anos, os estudos de Biologia Molecular têm levado a uma nova caracterização das neoplasias bem diferenciadas da tireóide de origem folicular (42). Do ponto de vista molecular, quase todo carcinoma papilífero é diplóide ou quase diplóide e apresenta estabilidade de microssatélites. Estas neoplasias apresentam caracteristicamente rearranjos RET/PTC e TRK. O rearranjo RET/PTC1 ocorre preferencialmente em carcinomas papilíferos que formam papilas e o rearranjo RET/PTC3 ocorre mais nas variantes sólida e folicular (14, 43). O rearranjo

RET/PTC está associado com a presença das características nucleares clássicas dos carcinomas papilíferos e ocorre nos estágios iniciais da tumorigênese (44-46). Não ocorre nas neoplasias com núcleos de tipo folicular (47). Os carcinomas com este rearranjo geralmente não progridem para carcinoma pouco diferenciado ou indiferenciado (48, 49). Os carcinomas papilíferos também podem apresentar mutação do gene RAS (menos frequentemente do que as neoplasias foliculares), aumento da expressão de c-met e redução da caderina-E (49-54).

Mais recentemente evidenciou-se que, após o melanoma, o carcinoma papilífero da tireóide é a neoplasia com maior prevalência de mutações no gene BRAF, que pertence à família RAF das proteino-quinases que são componentes importantes da via de sinalização MAPK, a qual media o crescimento, diferenciação e sobrevivência celulares e ocorre quase sempre no mesmo local (*hot spot*) (V600E, previamente designado V599E) (55). Esta mutação consiste em uma transversão de timina por adenina na posição 1799, levando a uma substituição de valina por glutamato no codon 600. É encontrada em 29 a 69% dos carcinomas papilíferos (56, 57), sendo o evento genético mais comum nestes carcinomas do adulto (57-59). Por outro lado, é rara em crianças e adultos jovens, na forma esporádica ou após irradiação (56, 60, 61). Estes pacientes em geral apresentam rearranjo RET/PTC (59). Conforme relatamos em estudos já publicados (62, 63), a mutação V600E é quase restrita aos carcinomas papilíferos convencionais, com padrões papilíferos ou misto papilífero-folicular, principalmente nos tumores com arquitetura papilífera proeminente, incluindo a variante de células altas e a *Warthin-like*. Ocorre também nos carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos, principalmente nos que se originam de carcinomas papilíferos prévios, ao contrário do que se observa no

rearranjo RET/PTC (14, 58, 64). Um outra mutação do gene BRAF (K600E) é encontrada na variante folicular do carcinoma papilífero, em cerca de 9-10% dos casos (64, 65). O significado prognóstico destas mutações permanece indefinido (14, 66), com estudos evidenciando pior prognóstico nos tumores com este fenótipo (57). O fato de mutações do gene BRAF ocorrerem em microcarcinomas e tumores com baixo estadiamento e em carcinomas papilíferos avançados e tumores indiferenciados sugere que esta mutação seja um evento precoce e provavelmente insuficiente para aquisição de um fenótipo agressivo, mas que pode predispor as células tumorais à aquisição de alterações genéticas adicionais que podem levar a maior agressividade e desdiferenciação (58). A presença de mutações nos genes RAS, BRAF e rearranjo RET/PTC na maioria dos carcinomas papilíferos indica que as alterações no caminho de transdução de sinais RET/PTC-RAS-BRAF-MAPK é importante na sua etiopatogênese (14, 58). É também importante ressaltar que os três grupos de mutações (RET, RAS e BRAF) parecem ser funcionalmente similares e mutuamente excludentes (14, 52, 55, 58, 59). Recentemente, identificou-se outro mecanismo de ativação do gene BRAF, envolvendo inversão do cromossomo 7q que resulta na fusão AKAP9-BRAF (55). É raro nos carcinomas papilíferos esporádicos e mais comum em tumores associados com radiação (55). Outro mecanismo também recentemente proposto para alteração no BRAF envolve aumento do número de cópias do gene, que é raro nos carcinomas papilíferos mas foi identificado em 16-45% dos tumores foliculares convencionais e oncocíticos (67). Os carcinomas foliculares com aumento do número de cópias do gene tendem a ser extensamente invasivos na mesma casuística.

Diferente do que é relatado no carcinoma folicular, os carcinomas foliculares são caracterizados pela aneuploidia e pela alta prevalência de mutações no gene RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ (14). A aneuploidia parece correlacionar-se com instabilidade cromossômica e já ocorre nos adenomas foliculares, principalmente nos de padrão fetal/embrionário (68, 69). Em 60% destes tumores foliculares, o conteúdo de DNA é triploide (69). Mutações no gene RAS podem estar envolvidas na instabilidade cromossômica e aneuploidia (14). A aneuploidia e as várias alterações moleculares encontradas nos adenomas e carcinomas foliculares sugerem que nestas neoplasias a tumorigênese envolva várias etapas, fazendo com que geralmente sejam lesões únicas. As mutações no gene RAS são freqüentes nos adenomas e carcinomas foliculares e não têm valor diagnóstico nestas neoplasias (14). Existem 3 famílias de oncogenes RAS (K-RAS, H-RAS e N-RAS), com localizações cromossômicas separadas. Em geral o N-RAS e com menor freqüência o H-RAS estão mutados no codon 61 (e menos frequentemente nos codons 12 e 13) (14). Mutações do gene RAS ocorrem freqüentemente nas formas precoces dos tumores da tireóide, com relato de até 50% dos adenomas microfoliculares da tireóide apresentarem ativação do oncogene RAS (70). Esta ativação também é encontrada na tireóide adjacente aos nódulos neoplásicos (71) e parece participar da formação do bócio adenomatoso (72). Não se conseguiu ainda atribuir significado prognóstico significativo às mutações no RAS, com resultados variáveis na literatura (14, 51). O ponto de vista prevalente é que a ativação do RAS provavelmente representa um evento precoce na tumorigênese da tireóide, insuficiente por si só para transformação maligna (73). Outros acreditam que mutações do RAS favorecem a progressão para carcinoma

pouco diferenciado e anaplásico, tanto nos carcinomas foliculares quanto nos papilíferos, provavelmente após mutações adicionais (74).

O rearranjo PAX8-PPAR γ foi inicialmente descrito apenas nos carcinomas foliculares, sugerindo que pudesse ser um marcador nuclear de malignidade nas neoplasias foliculares (75-77). Posteriormente foi também identificado nos adenomas foliculares, mas permanece como um dos aspectos moleculares que caracterizam as neoplasias foliculares (14, 77-80). Decorre de uma translocação t(2;3)(q13;p25) que resulta na fusão do gene PAX8, que codifica um fator de transcrição da tireóide, com o gene PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*) (80). As células foliculares normais da tireóide têm alta expressão do gene PAX8, sendo o fator de transcrição resultante essencial para o desenvolvimento da tireóide e regulação do funcionamento celular. O gene PPAR γ está envolvido na inibição do crescimento e promoção da diferenciação celular nas células foliculares normais. O rearranjo dos dois genes interfere com a função de ambos, podendo favorecer a tumorigênese (79). Ocorre em 29 a 56% dos carcinomas foliculares e 0 a 13% dos adenomas (76, 79, 80). O valor prognóstico deste rearranjo permanece controverso, com estudos mostrando que tende a ocorrer em carcinomas foliculares extensamente invasivos, sendo em geral ausente nos minimamente invasivos (80), ou está associado com invasão vascular e padrão sólido da neoplasia (81). Outros estudos mostram correlação com malignidade, mas, dentre os carcinomas, parecem associar-se com os de melhor prognóstico (82). Não é encontrado nos carcinomas papilíferos convencionais (79, 80). No entanto, foi observado por nós na variante folicular do carcinoma papilífero, com frequência (37,5%) similar à dos carcinomas (45,5%) e

adenomas foliculares (33,3%), sendo significativamente associado com multifocalidade, invasão vascular e invasão capsular (65).

1.3. Aspectos morfológicos e moleculares da classificação de tumores da tireóide, OMS / 2004

A nova classificação dos tumores da tireóide (20) reflete o atual estado de conhecimento sobre a etiopatogênese e comportamento dos nódulos. Alguns tópicos de especial interesse desta classificação incluem a inserção das lesões oncocíticas como variantes dos adenomas ou carcinomas foliculares e do carcinoma papilífero, além do reconhecimento de condições em que não é possível para o patologista a plena caracterização de malignidade em neoplasias foliculares, passando tais lesões a ser denominadas “tumores foliculares de potencial incerto de malignidade”.

Os estudos de Biologia Molecular contribuíram para melhor compreensão das neoplasias de células de Hürthle. Da década de 40 até o início dos anos 80, acreditava-se que todos os tumores oncocíticos da tireóide fossem malignos ou potencialmente malignos (9, 22, 83). Posteriormente, as neoplasias de células de Hürthle foram consideradas como um grupo à parte dentro do grupo das neoplasias foliculares, com os mesmos critérios diagnósticos dos carcinomas foliculares: invasão vascular e/ou capsular inequívocas (7, 22, 83). Com a descrição do carcinoma papilífero variante *Warthin-like* ficou caracterizada uma neoplasia oncocítica dentro do grupo dos carcinomas papilíferos, com todas as características

nucleares típicas destes carcinomas e expressão do RET/PTC (84, 85). Nos últimos anos, outros estudos mostraram a existência de mutações características dos carcinomas papilíferos em neoplasias de células de Hürthle, como o rearranjo RET/PTC e mutações no gene BRAF, caracterizando as bases moleculares do carcinoma papilífero variante oncocítica (63, 86-88). As alterações moleculares também se correlacionam com a presença de alterações nucleares características dos carcinomas papilíferos nestas lesões e metástases em linfonodos regionais (89). Por outro lado, o rearranjo PAX8-PPAR γ , descrito principalmente nos carcinomas foliculares e inicialmente não identificado nas neoplasias de células de Hürthle, foi encontrado nos carcinomas oncocíticos com núcleos do tipo folicular, embora com baixa frequência (3-4%) (51, 80, 81).

O comportamento clínico das neoplasias oncocíticas tende a ser semelhante ao das neoplasias correspondentes não oncocíticas, considerando mesma idade e estadiamento (7, 9, 17, 90-93). A maioria dos estudos mostra como indicadores de pior prognóstico idade superior a 45 anos, sexo masculino, tamanho do tumor primário (maior do que 4 cm) e extensão da invasão, semelhantes aos das neoplasias foliculares convencionais (90, 93, 94). As mutações no DNA mitocondrial a princípio poderiam contribuir para a transformação neoplásica, modificando o metabolismo celular e/ou modulando a apoptose, mas parece paradoxal associar a presença de numerosas mitocôndrias anormais com maior agressividade tumoral (11). O principal aspecto negativo intrínseco das neoplasias oncocíticas é sua menor capacidade de captação de iodo, dificultando sua detecção e reduzindo a resposta ao iodo radioativo, o que se traduz em pior prognóstico para os pacientes (9, 11, 83). Na maioria dos trabalhos publicados não se tem encontrado diferenças significativas

entre as células de Hürthle e as células foliculares usuais considerando a prevalência de aneuploidia, trissomia dos cromossomos 5,7 e 12 e mutações de oncogenes / genes oncosuppressores (11). No entanto, permanece em grande parte dos trabalhos o conceito de que a porcentagem de tumores foliculares oncocíticos malignos é maior do que nas neoplasias foliculares convencionais (9, 11, 15, 83, 95-98). Alguns trabalhos não encontram maior incidência de malignidade em lesões foliculares de células de Hürthle, sendo idade e sexo do paciente mais importantes como fatores preditivos de malignidade (99).

O conceito de que toda neoplasia de origem folicular da tireóide tem sua versão oncocítica é a base da mudança introduzida na classificação da OMS/2004, que substitui o carcinoma de células de Hürthle pelas variantes oncocíticas dos carcinomas papilífero, folicular e pouco diferenciado (20). Os carcinomas anaplásicos raramente são oncocíticos, provavelmente por sua alta atividade proliferativa, impedindo o acúmulo citoplasmático de mitocôndrias. Os critérios diagnósticos destas variantes são os mesmos das neoplasias convencionais: as características nucleares nos carcinomas papilíferos e invasão vascular e/ou capsular nos carcinomas foliculares (13, 20). Nos carcinomas papilíferos podem também ser utilizados marcadores imuno-histoquímicos como auxiliares diagnósticos nos casos com morfologia nuclear duvidosa. Têm sido utilizados vários marcadores como citoqueratina 19, HBME-1, galectina-3, galectina-7, ret, proteína S-100, p27Kp1, Rb, entre outros, citados em vários trabalhos de diferentes grupos, alguns já utilizados como auxiliares na prática diagnóstica em nosso meio (100-103). Os carcinomas papilíferos oncocíticos exibem núcleos grandes, com irregularidade e dobras da membrana nuclear, aspecto vazado e pseudo-inclusões; as neoplasias foliculares

oncocíticas apresentam núcleos grandes, hipercromáticos, com pleomorfismo variável e nucléolo evidente (7, 11).

O grupo dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade, incorporado na nova classificação da OMS/2004, também pode ter sua variante oncocítica e é diagnosticado pela presença de alta celularidade e cápsula espessa e irregular, mas sem invasão inequívoca para diagnóstico conclusivo de malignidade (20). É uma categoria polêmica, inicialmente proposta por Williams et al. para situações especiais, em que o patologista mesmo após estudo adequado e extenso do nódulo ainda não tivesse parâmetros para diagnóstico definitivo de malignidade, mas ao mesmo tempo não considerasse a lesão um adenoma folicular usual (104, 105). Outros autores preferem designá-los com adenomas, por falta de critérios de malignidade (42).

Nos dias atuais, mesmo reconhecendo a significativa contribuição da Biologia Molecular para o melhor entendimento do que parece ser um grupo heterogêneo de “neoplasias de células de Hürthle”, é fundamental reconhecermos que, nestes nódulos ricos em células oxifílicas, assim como em toda a patologia da tireóide, a essência do diagnóstico continua fundamentada no estudo morfológico cuidadoso dos nódulos, considerando aspectos citológicos e arquiteturais. Permanece em estudo a relação entre oxifilia e tumorigênese.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

1) reavaliar um conjunto de lesões nodulares da tireóide, neoplásicas ou não neoplásicas, de acordo com a nova classificação da OMS (2004), analisando criticamente as categorias, em especial as recém-incluídas variantes oncocíticas das neoplasias e o grupo dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade nos contextos clínico, morfológico e molecular;

2) avaliar a contribuição imuno-histoquímica para a identificação de algumas categorias diagnósticas, analisando especialmente a reatividade da citoqueratina 19 na diferenciação entre as neoplasias foliculares e papilíferas e a distribuição da citoqueratina 14 e da citocromo-oxidase nas lesões com componente oxifílico;

3) avaliar a distribuição da oxifilia, dos dados clínico-patológicos, imuno-histoquímicos e a presença de mutações no gene BRAF nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade e nos carcinomas;

4) avaliar os padrões de oxifilia, dados clínico-patológicos, imuno-histoquímicos e a presença de mutações no gene RAS e do rearranjo PAX8-PPAR γ , nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade, em comparação com os carcinomas foliculares.

3. MÉTODOS

3.1. Seleção dos casos e revisão morfológica

Foram selecionados 205 casos de nódulos da tireóide de origem em epitélio folicular do arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil), correspondentes a peças cirúrgicas provenientes de tireoidectomias parciais ou totais. Para este estudo de série de casos foram incluídos apenas aqueles com dados clínicos e macroscópicos disponíveis, representação adequada da lesão, processamento histológico apropriado e disponibilidade de blocos de parafina em boas condições. As peças cirúrgicas foram recebidas para análise no período de 1994 a 2002. Os casos foram selecionados de modo a obtermos lesões correspondentes aos principais grupos de nódulos de origem folicular da tireóide.

Todas as peças cirúrgicas foram fixadas em formalina a 10% tamponada, submetidas a processamento para cortes histológicos e emblocadas em parafina. Cortes histológicos com 4 micrômetros de espessura foram corados com hematoxilina e eosina para exame histológico. Os dados clínicos e macroscópicos disponíveis foram coletados (idade e sexo do paciente, tamanho do nódulo, multicentricidade, invasão vascular e capsular, extensão extra-glandular, presença de metástases ganglionares e hematogênicas) Todos os casos foram integralmente

revistos pela autora e todos os carcinomas foram também revistos pelo professor Manuel Sobrinho-Simões, patologista internacionalmente reconhecido e membro da Comissão Responsável pela recente Classificação de Tumores da Tireóide - OMS, 2004. Os diagnósticos seguiram os critérios desta nova classificação da OMS (2004), dividindo as neoplasias em adenomas foliculares, carcinomas foliculares, carcinomas papilíferos, carcinomas pouco diferenciados e carcinomas anaplásicos, cada grupo subclassificado em “padrão convencional” ou “variante oxifílica”. Utilizou-se também o conceito de tumor folicular de potencial incerto de malignidade (TFPIM) proposto por Williams et al. e aceito pela classificação da OMS/2004, para lesões suspeitas (alta celularidade, cápsula espessa e irregular), porém sem sinais inequívocos de invasão capsular e/ou vascular (2, 20, 104). Em relação à oxifilia, as lesões foram classificadas como tendo oxifilia clássica se havia mais de 75 % células de Hurthe (7, 20). Propusemos aqui o termo “oxifilia parcial” para aqueles casos com menos de 75 % de células de Hürthle e/ou aspecto oncocitóide apenas. A distribuição dos casos de acordo com o subtipo histológico e grau de oxifilia está demonstrada na tabela 1.

Foi selecionado um bloco representativo de cada caso, do qual foram cortadas lâminas para exame imuno-histoquímico (cortes teciduais de 3 micrômetros, em lâminas com silano) e retirado material para extração de DNA. Nos casos com vários nódulos, foi escolhido aquele mais oxifílico e mais celular.

Tabela 1 - Diagnóstico histológico e oxifilia

DIAGNÓSTICO	OXIFILIA			CASOS (TOTAL)
	Clássica	Parcial	Ausente	
Bócio adenomatoso	24 (45,3%)	24 (45,3%)	5 (9,4%)	53
Adenoma folicular	9 (22,0%)	15 (36,6%)	17 (41,5%)	41
Carcinoma folicular	23 (69,7%)	5 (15,2%)	5 (15,2%)	33
Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	7 (53,8%)	1 (7,7%)	5 (38,5%)	13
Carcinoma papilífero	12 (20,7%)	28 (48,3%)	18 (31,0%)	58
Carcinoma pouco diferenciado	2 (40,0%)	1 (20,0%)	2 (40,0%)	5
Carcinoma anaplásico	0	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2
TOTAL	77 (37,6%)	75 (36,6%)	53 (25,9%)	205

3.2. Exame imuno-histoquímico

Todos os casos foram submetidos a exame imuno-histoquímico para avaliação da expressão das citoqueratinas 14 e 19 e da enzima mitocondrial citocromo-oxidase. Para evitar reação endógena devido a presença de biotina e avidina, foram utilizados polímero dextran e sistema de amplificação enzimática Envision (Dakocytomation, Denmark). Resumidamente, cortes teciduais de 3- μ m foram submetidos a recuperação antigênica pelo calor por 3 minutos em panela de

pressão, com solução de ácido cítrico 10 mM/pH 6.0 e bloqueio da peroxidase endógena com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 6%. A incubação com o anticorpo primário foi feita a 37° C em câmara úmida, seguida de incubação de um dia para o outro por 16 horas, a 4° C.

Anticorpos primários:

- anti-citoqueratina 19: Anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano (clone RCK108, Dakocytomation, Denmark), 1:100. Sistema de amplificação: Envision-peroxidase. Substrato: H202 + diaminobenzidina.
- anti-citocromo-oxidase: Anticorpo policlonal de coelho anti-humano (R&D, USA). 1:40. Sistema de amplificação: Envision-peroxidase. Substrato: H202 + diaminobenzidina.
- anti-citoqueratina 14: Anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano (clone LL002; Novocastra, UK) 1:100. Sistema de amplificação: Envision - fosfatase alcalina. Substrato: naftolfosfato + *fast red*.

Para cada reação houve um controle positivo (amostra de tireóide previamente positiva) e um controle negativo (outro corte da mesma amostra de tireóide, com substituição do anticorpo primário por soro não imune, seguida de todos os passos da imunorreação).

As reações foram classificadas quanto à intensidade em: ausente, + (muito fraco), ++ (fraco), +++ (moderado) e ++++ (forte), e quanto à distribuição em: + (muito focal), ++ (menos de 50% células positivas), +++ (mais de 50 % de células positivas, multifocal) e ++++ (difuso). A mesma classificação foi utilizada no tecido glandular adjacente (Anexo A).

3.3. Pesquisa de mutações dos genes RAS e BRAF e rearranjo PAX8-PPAR γ

DNA genômico foi extraído de cortes teciduais de 10 μ m obtidos dos blocos de parafina. Foram estudados 46 carcinomas papilíferos, 27 carcinomas foliculares, 12 tumores foliculares de potencial incerto de malignidade, 3 carcinomas pouco diferenciados e 1 carcinoma anaplásico. Foram pesquisadas:

- mutações do gene BRAF nos carcinomas papilíferos, foliculares, pouco diferenciados e anaplásicos e nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade;
- mutações no gene RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ nos carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade.

As lâminas foram examinadas ao microscópico e áreas tumorais foram marcadas e cuidadosamente dissecadas sob observação microscópica. O material dissecado foi desparafinado em xilol, lavado em etanol e reidratado. Extração do DNA foi feita usando o *Genomic DNA Purification Kit (Gentra System)* de acordo com protocolo do fabricante. Resumidamente, o material microdissecado foi novamente suspenso em 300 μ l de Tampão para Lise Celular com 30 μ g de proteinase K e incubado a 56°C durante 3 dias, com adição diária de 30 μ g de proteinase K. Depois da inativação da proteinase K e remoção de proteína, O DNA genômico foi precipitado com isopropanol e glicogênio, e lavado com etanol. O DNA foi então seco e reidratado com Tampão para Hidratação.

Sequências dos genes H-RAS (exons 1 e 2), K-RAS (exons 1 e 2), N-RAS (exon 2) e BRAF (exons 11 e 15) foram amplificadas usando os *primers* adequados listados na tabela 2. A mistura para PCR (25 µl) continha 2.5 µl de 10X *Complete PCR Buffer* (Bioron), 1 µl de dNTPs (5mM cada), 0.1 µg de cada *primer*, 0.1-0.5 µg de DNA genômico e 0.2U de Taq DNA Polimerase (Bioron). Depois de 10 minutos de desnaturação inicial, as misturas para PCR foram submetidas a 35 ciclos de desnaturação por 30seg a 95°C, anelamento por 45 seg a temperatura variável de acordo com o amplicon (tabela 1), e extensão por 45 seg a 72°C. Um período final de extensão de 10 min a 72°C foi realizado para concluir a reação.

Os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese (SSCP) em gel MDE 0.8% para análise de possíveis mutações. Como a análise por SSCP não foi capaz de discriminar alterações no exon 2 do N-RAS, este gene foi estudado apenas por seqüenciamento direto. O gel foi corado pela prata e as amostras com bandas suspeitas foram purificadas por tratamento enzimático. As amostras purificadas foram seqüenciadas nas duas cadeias da seguinte forma: 3 µl de produto do PCR purificado foi adicionado a 7 µl de reagente de seqüenciamento contendo 2,7 l de 2,5X *big Dye Buffer* (Applied Biosystems), 30ng de *primer* e 1 µl de *Big Dye terminator v3.1 cycle* (Applied Biosystems). O seqüenciamento foi feito em aparelho ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Amostras com mutações foram novamente extraídas, amplificadas e sequenciadas para confirmar os resultados.

Hibridização *in Situ* Fluorescente (*FISH*) foi realizada em núcleos isolados extraídos de cortes histológicos de 50µm dos blocos de parafina de 39 casos de tumores foliculares da tireóide. Foram usadas sondas (*probes*) BAC para PPARγ

(RPCI1130 G23, BAC PAC Resources) e PAX8 (RPCI 1165 I12, BAC PAC Resources). Resumidamente, o PPAR γ BAC clone DNA foi marcado com digoxigenina e o PAX8 BAC clone DNA com biotina pelo sistema “*random priming*”, usando o *Bioprime DNA labeling system* (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain). Suspensões nucleares foram distribuídas em lâminas especiais SuperFrost (Menzel-Glaser, GmbH, Memmert, Germany) e pré-tratadas com pepsina 0,1% (Sigma- Aldrich, St Louis, Missouri, USA) em 0,2% HCL a 37°C. Mistura da sonda (*probe*) em formamida 50% em 2xSSC foi co-denaturada com o DNA nuclear a 80°C por 2 minutos. Detecção da sonda PPAR γ marcada pela digoxigenina foi feita usando um anticorpo fluorescente anti-digoxigenina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) e a da sonda PAX8 marcada pela biotina foi feita com CY₃-avidina (Jackson Immunoresearch Lab, West Grove, USA). Os núcleos foram contracolorados com a solução de montagem DAPI-Vectashield (Vector, Burlingame, USA). Os sinais fluorescentes de hibridização foram analisados e gravados com o Cytovision System (Applied Imaging, New Castle, UK). Para cada caso, 200 núcleos intactos foram contados. Núcleos nos quais os dois probes estavam fundidos ou encostados foram contados como positivos para a fusão do gene. A presença do gene de fusão PAX8-PPAR γ foi investigada por RT-PCR, como já descrito anteriormente (63).

Tabela 2 - *Primers e condições de PCR e SSCP*

GENE	EXON	SEQUÊNCIA DO PRIMER	COMPRIMENTO (BP)	TEMPERATURA PCR	CONDIÇÕES SSCP
K-RAS	1	F- GACTGAATATAAACTTGTGG	107	53°C	180V, 14h, 18°C
		R- CGAATATGATCCAACAATAG			
	2	F- TTCCTACAGGAAGCAAGTAG	181	54°C	180V, 14h, 18°C
		R- AGATATTCACCATTATAGGTGG			
H-RAS	1	F- GAGGAGCGATGACGGAATAT	133	57°C	180V, 16h, 8°C
		R- TAGAGGTGAGCCTGGCGCC			
	2	F- GATTCTTACCGGAAGCAGGTG	164	58°C	180V, 16h, 8°C
		R- ACAACACCAAGTCTTTTGAGGA			
N-RAS	2	F- GATTCTTACAGAAAACAAGT	119	58°C	Sequenciamento direito
		R-AATACATGAGGACAGGCGAAGG			
B-RAF	11	F- TCCCTCTCAGGCATAAGGTAA	313	58°C	180V, 16h, 8°C
		R- ATCAAAGGAAATATTTACTGTT			
	15	F- TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA	224	58°C	180V, 16h, 8°C
		R- TCCACTGATTAAATTTTGCC			

3.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores médios (idade dos pacientes e tamanho dos nódulos), porcentagem ou números absolutos. Tabelas de contingência foram elaboradas para testar associação entre as variáveis qualitativas. O teste do

Chi-quadrado (Pearson) foi utilizado na análise estatística dos resultados. Para as variáveis quantitativas (idade e diâmetro do nódulo) foi empregada a técnica de análise de variância (ANOVA – Analysis of Variance), para a comparação das médias. A estatística do teste foi a F-Fisher. Dois valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Revisão morfológica de acordo com a nova classificação OMS/2004, com ênfase no grau de oxifilia

A distribuição dos casos de acordo com o grau de oxifilia e diagnóstico histológico está demonstrada na tabela 1 e figuras 1, 2, 3 e 4. Evidenciou-se oxifilia, em coloração de rotina (H&E), em todos os grupos de tumores. Relatamos não só a oxifilia clássica, correspondente a mais de 75% de células oncocíticas na lesão, mas também o que chamamos de oxifilia parcial, correspondente a aspecto oncocitóide ou presença de células de Hürthle em menos de 75% do nódulo.

Figura 1 - Oxifilia clássica e diagnóstico histológico (número de casos e porcentagem entre parênteses)

Figura 2 - Oxifilia parcial e diagnóstico histológico (número de casos e porcentagem entre parênteses)

Figura 3 - Oxifilia ausente e diagnóstico histológico (número de casos e porcentagem entre parênteses)

BA: bócio adenomatoso; AF: adenoma folicular; CF: carcinoma folicular; TFPIM: tumor folicular de potencial incerto de malignidade; CP: carcinoma papilífero

Figura 4 - Oxifilia e diagnóstico histológico nas lesões benignas e de potencial incerto de malignidade e nos carcinomas bem diferenciados

Bócio adenomatoso foi diagnosticado em 53 casos, em geral de padrão multinodular e com baixa a moderada celularidade. Oxifilia clássica esteve presente em 45,3% destas lesões e oxifilia parcial em outros 45,3%. Adenomas foliculares, correspondentes a nódulos únicos e com cápsula delgada e íntegra, foram diagnosticados em 41 casos, 22,0% com oxifilia clássica e 36,6% com oxifilia parcial.

Dentre os 33 carcinomas foliculares, 27 casos foram classificados como minimamente invasivos e seis como extensamente invasivos. Invasão vascular foi o critério mais freqüente de malignidade (presente em 20 casos) e considerado por nós o mais confiável e também o de maior repercussão biológica, associado ou não a invasão capsular (presente em 10 casos). O grupo dos carcinomas foliculares extensamente invasivo correspondeu a 6 casos. A maior parte dos carcinomas foliculares (23 casos – 69,7%) apresentou oxifilia clássica, correspondendo ao carcinoma de células de Hürthle tradicional. Evidenciou-se oxifilia parcial em outros 15,2% destes carcinomas.

O grupo dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade (TFPIM) correspondeu a 13 casos, sendo oxifilia encontrada em 8 (61.5%). Englobou nódulos com alta celularidade e cápsula espessa e irregular, porém sem invasão vascular ou capsular inequívoca que permitisse diagnóstico conclusivo de malignidade. Haviam sido previamente diagnosticados como carcinomas foliculares, mas na presente revisão especializada, seguindo estritamente os critérios da nova classificação da OMS, 2004, realocamo-los neste grupo, já que também não poderiam ser chamados de adenomas foliculares usuais.

Foram diagnosticados 58 carcinomas papilíferos, pela presença de características nucleares clássicas: 40 (69,0%) apresentaram algum grau de oxifilia, clássica em 12 (20,7%) e parcial em 28 casos (48,2%).

Os carcinomas pouco diferenciados (5 casos) exibiam invasão extensa, atipia e necrose. Os carcinomas anaplásicos (2 casos) tinham aspecto clássico, sarcomatóide. Um deles apresentou oxifilia parcial.

A distribuição da oxifilia mostrou-se estatisticamente relacionada com o subtipo histológico ($p < 0,001$). Em sua maioria, os nódulos com bócio adenomatoso apresentavam oxifilia clássica ou parcial. Dentre as neoplasias, os adenomas foliculares exibiam oxifilia parcial ou ausente, carcinomas foliculares tinham em geral oxifilia clássica e os carcinomas papilíferos apresentavam oxifilia ausente ou parcial (figura 4). Nos outros tipos de nódulos, o pequeno número de casos não permitiu avaliar uma associação.

A **CK 19** foi pesquisada em todos os casos através de exame imuno-histoquímico (figuras 5, 6, 7a e 7b), resultando positiva em 63, sendo 45 carcinomas papilíferos. A positividade mostrou-se intensa (3+ ou 4+) em 34 (58,6%) dos carcinomas papilíferos (tabela 3). Nos carcinomas papilíferos sem oxifilia esta positividade ocorreu em 44,4% dos casos, nos carcinomas com oxifilia parcial em 75,0 % e nos carcinomas com oxifilia clássica em 41,7%. Houve associação significativa entre o diagnóstico de carcinoma papilífero e expressão da CK 19 ($p < 0,001$), mas não foi estatisticamente significativa a associação entre oxifilia e expressão da CK 19 ($p = 0,188$). Vale ressaltar que houve imuno-expressão intensa para CK19 em apenas um caso de carcinoma pouco diferenciado e em uma área de um carcinoma folicular que retrospectivamente já poderia ser considerada em transformação para carcinoma pouco diferenciado. Não foi evidenciada reatividade intensa para CK 19 em nenhum dos casos de bócio adenomatoso, adenoma folicular, carcinoma anaplásico ou TFPIM. Poucos casos evidenciaram positividade para CK19 na tireóide não tumoral, sempre associada a tireoidite crônica linfocitária (Anexo A).

Tabela 3 - Imuno-expressão da citoqueratina 19 de acordo com o diagnóstico histológico e oxifilia

DIAGNÓSTICO	OXIFILIA	CK 19 (-)	CK 19 + / ++	CK 19 +++ / ++++
Bócio adenomatoso (n=53)	Clássica (n=24)	21	3	0
	Parcial (n=24)	24	0	0
	Ausente (n=05)	5	0	0
	TOTAL	50 (94,3 %)	3 (5,7%)	
Adenoma folicular (n=41)	Clássica (n=9)	7	2	0
	Parcial (n=15)	13	2	0
	Ausente (n=17)	15	2	0
	TOTAL	35 (85,4%)	6 (14,6%)	
Carcinoma folicular (n=33)	Clássica (n=23)	21	1	1
	Parcial (n=5)	3	2	0
	Ausente (n=5)	4	1	0
	TOTAL	28 (84,9%)	4 (12,1%)	1 (3,0 %)
Tumor folicular de potencial incerto de malignidade (n=13)	Clássica (n=7)	6	1	0
	Parcial (n=1)	1	0	0
	Ausente (n=5)	5	0	0
	TOTAL	12 (92,3%)	1 (7,7%)	
Carcinoma papilífero (n=58)	Clássica (n=12)	3	4	5
	Parcial (n=28)	3	4	21
	Ausente (n=18)	5	5	8
	TOTAL	11 (1,0%)	13 (22,4%)	34 (58,6%)
Carcinoma pouco diferenciado (n=5)	Clássica (n=2)	1	1	0
	Parcial (n=1)	1	0	0
	Ausente (n=2)	1	0	1
	TOTAL	3 (60,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)
Carcinoma anaplásico (n=2)	Clássica (n=0)	0	0	0
	parcial (n=1)	1	0	0
	ausente (n=1)	1	0	0
	TOTAL	2 (100%)		
TOTAL DE CASOS = 205		141 (68,8%)	28 (13,6%)	36 (17,6%)

Figura 5 - Imunorreatividade intensa (+++++) para CK19 em carcinoma papilífero *Warthin-like* – caso 17-6116-1 (400x)

Figura 6 - Imunorreatividade fraca (++) para CK19 em carcinoma folicular convencional minimamente invasivo – caso 45-6879-6 (400x)

Figura 7a - Imunorreatividade focal fraca (++) para CK19 em b6cio adenomatoso caso 17-5300-2 (400x)

Figura 7b – Mesmo caso (17-5300-2), H&E (400x)

A pesquisa imuno-histoquímica de **CK 14** evidenciou apenas positividade focal em um dos casos, que exibia oxifilia parcial, não se mostrando útil para a avaliação da oxifilia em nossa casuística.

A imunorreatividade para a enzima mitocondrial **citocromo-oxidase** definiu de modo muito mais claro a presença de oxifilia (figuras 8a, 8b, 9a, 9b, 10a e 10b), tendo positividade forte (+++ ou ++++) em 48,0 % dos casos com oxifilia clássica na revisão histológica e em 25,3 % nos casos com oxifilia parcial (tabela 4). Esta positividade mostrou-se mais elevada, 83,1 % e 64,0 %, ao considerarmos todos os graus de positividade. Casos com positividade fraca ou ausente não puderam ser claramente identificados nos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina, não se caracterizando sua associação com qualquer dos subtipos histológicos. A positividade na tireóide não nodular foi sempre focal, em áreas de tireoidite crônica linfocitária ou bócio adenomatoso (figura 11). A análise da distribuição da imunorreatividade ajudou na avaliação da porcentagem de células oxifílicas na lesão (Anexo A).

O achado morfológico de oxifilia mostrou-se significativamente associado à imuno-expressão da citocromo-oxidase nos casos de bócio adenomatoso, adenoma folicular e carcinoma folicular. Para os demais tipos, não foi detectada associação significativa (tabela 4). Observamos que nenhum carcinoma pouco diferenciado teve imuno-expressão forte para citocromo-oxidase e 2 dos 18 carcinomas papilíferos sem oxifilia nos cortes corados pela hematoxilina-eosina tiveram intensa imunorreatividade para esta enzima.

Tabela 4 - Imuno-expressão da citocromo-oxidase de acordo com o diagnóstico histológico e oxifilia

DIAGNÓSTICO	OXIFILIA	CO (-)	CO + / ++	CO +++/++++	p
Bócio adenomatoso (n=53)	Clássica (n=24)	1 (4,2%)	12 (50,0%)	11 (45,8%)	0,006
	Parcial (n=24)	12 (50,0%)	6 (25,0%)	6 (25,0%)	
	Ausente (n=5)	3 (60,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)	
TOTAL	53 (100%)	16 (30,2%)	19 (35,8%)	18 (34,0%)	
Adenoma folicular (n=41)	Clássica (n=9)	0	2 (22,2%)	7 (77,8%)	0,001
	Parcial (n=15)	7 (46,7%)	3 (20,0%)	5 (33,3%)	
	Ausente (n=17)	8 (47,1%)	9 (52,9%)	0	
TOTAL	41 (100%)	15 (36,6%)	14 (34,1%)	12 (29,3%)	
Carcinoma folicular (n=33)	Clássica (n=23)	6 (26,1%)	5 (21,7%)	12 (52,2%)	0,007
	Parcial (n=5)	0	5 (100%)	0	
	Ausente (n=5)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	0	
TOTAL	33 (100%)	8 (24,2%)	13 (39,4%)	12 (36,4%)	
Tumor folicular de potencial incerto de malignidade (n=13)	Clássica (n=7)	2 (28,6%)	2 (28,6%)	3 (42,8%)	0,297
	Parcial (n=1)	0	1 (100,%)	0	
	Ausente (n=5)	3 (60,0%)	2 (40,0%)	0	
TOTAL	13 (100%)	5 (38,5%)	5 (38,5%)	3 (23,0%)	
Carcinoma papilífero (n=58)	Clássica (n=12)	3 (25,0%)	5 (41,7%)	4 (33,3%)	0,350
	Parcial (n=28)	7 (25,0%)	13 (46,4%)	8 (28,6%)	
	Ausente (n=18)	9 (50,0%)	7 (38,9%)	2 (11,1%)	
TOTAL	58 (100%)	19 (32,8%)	25 (43,1%)	14 (24,1%)	
Carcinoma pouco diferenciado (n=5)	Clássica (n=2)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0	0,659
	Parcial (n=1)	0	1 (100%)	0	
	Ausente (n=2)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0	
TOTAL	5 (100%)	2 (40,00%)	3 (60,0%)		
Carcinoma anaplásico (n=2)	Clássica (n=0)	0	0	0	—
	Parcial (n=1)	0	1 (100,0%)	0	
	Ausente (n=1)	0	1 (100,0%)	0	
TOTAL	2 (100%)		2 (100%)		
TOTAL DE CASOS = 205		65 (31,7%)	81 (39,5%)	59 (28,8%)

Figura 8a - Imunorreatividade intensa para citocromo-oxidase (++++), em adenoma folicular oncocítico – caso 16-8354-3 (400x)

Figura 8b - Mesmo caso (16-8354-3), H&E (400x)

Figura 9a - Imunorreatividade intensa para citocromo-oxidase (+++) em carcinoma papilífero Warthin-like – caso 51-2601-0 (400x)

Figura 9b - Mesmo caso (51-2601-0), H&E (400x)

Figura 10a - Imunorreatividade fraca para citocromo-oxidase (++) em adenoma folicular convencional – caso 36-0353-9 (400x)

Figura 10b - Mesmo caso (36-0353-9), H&E (400x).

Figura 11 - Imunorreatividade focal intensa (+++) para citocromo-oxidase em área de tireoidite crônica linfocitária – caso 47-0537-8 (400X)

4.2. Relação entre graus de oxifilia e variáveis clínico-patológicas

A oxifilia ausente ou parcial nos carcinomas papilíferos apresentou associação significativa com a multicentricidade. Há indícios de diferença das idades dos pacientes com oxifilia clássica *versus* ausente ($p=0,085$). No grupo com oxifilia ausente, a média de idade foi de 40,5 anos contra 54,6 anos no grupo com oxifilia clássica. Metástases pareceram ser mais frequentes nos tumores sem oxifilia, mas as diferença observada não foi estatisticamente significativa. Não foram significativas também as demais diferenças observadas na tabela 5.

Tabela 5 - Carcinoma papilífero: correlação entre oxifilia e dados clínico-patológicos

	OXIFILIA			ESTATÍSTICA	p
	Clássica	Parcial	Ausente		
Número de casos	10	30	18		
Sexo F/M (50/8)	7/3	27/3	16/2	$\chi^2=2,68$	0,262
Idade média (anos)	54,6	43,9	40,5	F=2,8	0,085
Tamanho médio do tumor (cm)	3,02	3,04	2,26	F=0,78	0,460
Invasão vascular	6 (60,0%)	14 (46,7%)	9 (50,0 %)	$\chi^2=0,53$	0,766
Invasão extra-tireoidea	4 (40,0%)	20 (66,6%)	9 (50,0%)	$\chi^2=1,66$	0,436
Multicentricidade	4 (40,0%)	22 (73,3%)	14 (77,8%)	$\chi^2=8,58$	0,014
Metástase ganglionar	3 (30,0%)	13 (43,3%)	11 (61,1%)	$\chi^2=2,76$	0,252

No grupo do carcinomas foliculares e TFPIM , não houve correlação entre oxifilia e as variáveis clínico-patológicas pesquisadas (tabela 6). A oxifilia clássica foi observada em pacientes com uma década a mais do que aqueles com oxifilia parcial ou ausente, mas não houve significância estatística nesta diferença das idades médias dos pacientes ($p = 0,308$).

Tabela 6 - Carcinoma folicular e tumor folicular de potencial incerto de malignidade: correlação entre oxifilia e dados clínico-patológicos

	OXIFILIA			ESTATÍSTICA	p
	Clássica	Parcial	Ausente		
Número de casos	29	6	10		
Sexo F/M (41/5)	26/3	6/0	8/2	$\chi^2=2,15$	0,709
Idade média (anos)	50,9	47,5	41,0	F=1,21	0,308
Tamanho médio do tumor (cm)	4,93	5,85	4,12	F=0,64	0,533
Invasão vascular	20 (68,9%)	5 (83,3 %)	5 (50,0%)	$\chi^2=1,92$	0,384
Invasão capsular	10 (34,5%)	4 (66,6%)	2 (20,0%)	$\chi^2=3,68$	0,159
Invasão extra-tireoidea	3 (10,3%)	1 (1,6%)	0	$\chi^2=1,47$	0,473

4.3. Mutações no gene BRAF e dados clínico-patológicos

A mutação no gene BRAF (V600E) foi evidenciada em 23/46 carcinomas papilíferos (50,0%) e em nenhum dos 27 casos de carcinoma folicular ou dos 12 casos de tumor folicular de potencial incerto de malignidade (figura 12, tabela 7). Foi encontrada em 42,9% dos casos de carcinomas papilíferos com oxifilia clássica, 50% dos com oxifilia parcial e 53,3% dos carcinomas papilíferos sem oxifilia. Estas proporções foram consideradas equivalentes ($p=0,901$). A presença ou não desta

mutação não influenciou as demais variáveis clínico-patológicas analisadas nos carcinomas papilíferos (sexo, gênero, idade, diâmetro do tumor, invasão vascular, extensão extra-tireoidea, multicentricidade e metástase ganglionar) (tabela 7).

Mutação no gene BRAF (V600E) foi encontrada em um carcinoma pouco diferenciado e em nenhum dos carcinomas anaplásicos, mas devido ao pequeno número destes tumores, não pudemos avaliar adequadamente o significado deste achado.

Figura 12 - Mutação no gene BRAF: eletroforese (SSCP) à esquerda; sequenciamento à direita

Tabela 7 - Relação entre diagnóstico histológico, oxifilia e mutações no gene BRAF (V600E) nos carcinomas papilíferos e foliculares e nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade

DIAGNÓSTICO	OXIFILIA	MUTAÇÃO NO GENE BRAF (V600E)	
		Ausente	Presente
Carcinoma papilífero (n=46)	Clássica (n=7)	4 (57,1%)	3 (42,9%)
	Parcial (n=24)	12 (50,0%)	12 (50,0%)
	Ausente (n=15)	7 (46,7 %)	8 (53,3%)
	TOTAL	23 (50,0%)	23 (50,0%)
Carcinoma folicular (n=27)	Clássica (n =19)	19 (100%)	0
	Parcial (n=4)	4 (100%)	0
	Ausente (n=4)	4 (100%)	0
	TOTAL	27 (100%)	27 (100%)
Tumor folicular de potencial incerto de malignidade (n=12)	Clássica (n=6)	6 (100%)	0
	Parcial (n=1)	1 (100%)	0
	Ausente (n=5)	5 (100%)	0
	TOTAL	12 (100%)	12 (100%)

4.4. Mutações no gene RAS e dados clínico-patológicos

Mutações do gene RAS (H-RAS e N-RAS) (figura 13) foram evidenciadas em 6 dos 27 carcinomas foliculares (22,2 %), mais frequentemente nos com oxifilia parcial (75,0%). Estas mutações também foram encontradas em 4 tumores foliculares

de potencial incerto de malignidade, 2 dos quais com oxifilia clássica e 2 sem oxifilia (tabela 8). A presença da mutação do gene RAS nos carcinomas foliculares teve associação significativa com oxifilia parcial ($p=0.021$) e invasão capsular ($p=0,030$) (tabelas 8 e 9). Não se correlacionou com nenhuma das outras variáveis clínico-patológicas estudadas nos carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade (sexo, idade, tamanho do tumor, invasão vascular e invasão extra-tireoidea) (tabelas 9 e 10).

Tabela 8 – Relação entre diagnóstico histológico, oxifilia e mutações no gene RAS nos carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade

DIAGNÓSTICO	OXIFILIA	MUTAÇÕES NO RAS	
		Presente	Ausente
Carcinoma folicular (n=27)	Clássica (n=18)	2 (11,1%)	16 (88,9%)
	Parcial (n=4)	3 (75,0%)	1 (25,0%)
	Ausente (n=5)	1 (20,0%)	4 (80,0%)
TOTAL		6 (22,2%)	21 (77,8%)
Tumor folicular de potencial incerto de malignidade (n=12)	Clássica (n=6)	2 (33,3%)	4 (66,7%)
	Parcial (n=1)	0	1 (100,0%)
	Ausente (n=5)	2 (40,0%)	3 (60,0%)
TOTAL		4 (33,3%)	8 (66,7%)

NOTA: Carcinoma folicular: associação entre oxifilia e mutações no RAS: $p=0,021$. Tumor folicular de potencial incerto de malignidade: associação entre oxifilia e mutações no RAS: $p=0,741$

Tabela 9 - Comparação dos dados clínico-patológicos de carcinomas foliculares com e sem mutações no gene RAS

	MUTAÇÃO RAS		ESTATÍSTICA	p
	Presente	Ausente		
Número de casos	6	21		
Sexo F/M	5/1	18/3	$\chi^2=0,021$	0,885
Idade média (anos)	38,0	52,2	F=2,868	0,103
Tamanho médio (cm)	4,9	5,5	F=0,137	0,714
Invasão vascular	5	19	$\chi^2=0,241$	0,623
Invasão capsular	5	7	$\chi^2=7,725$	0,030
Extensão extra-tireoidea	1	2	$\chi^2=0,241$	0,623

Tabela 10 - Comparação dos dados clínico-patológicos de tumores foliculares de potencial incerto de malignidade com e sem mutações no gene RAS

	MUTAÇÃO RAS		ESTATÍSTICA	p
	Presente	Ausente		
Número de casos	4	8		
Sexo F/M	4/0	6/2	$\chi^2=1,200$	0.273
Idade média (anos)	40,2±11,0	42,1±17,2	F=0,038	0.848
Tamanho médio (cm)	4,4±2,1	3,4±1,7	F=0,691	0.425

Figura 13 - Mutação do gene RAS (N-RAS): a) eletroforese (SSCP); b) seqüenciamento

4.5. Rearranjo PAX8-PPAR γ e dados clínico-patológicos

O rearranjo PAX8-PPAR γ (figura 14) esteve presente em 10 dos 27 carcinomas foliculares estudados (37,0%), sendo evidenciado em lesões com oxifilia clássica (22,2%), parcial (50%) ou ausente (80,0%) (tabela 11). Foi evidenciado também em 3 dos 12 tumores foliculares de potencial incerto de malignidade (25%), no grupo sem oxifilia (40,0%) e no único tumor com oxifilia parcial. Não foi encontrado em nenhum dos 6 tumores foliculares de potencial incerto com oxifilia clássica. Na nossa série, o rearranjo PAX8-PPAR γ foi portanto menos frequente nos

carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto com oxifilia clássica e mais freqüente nos carcinomas foliculares sem oxifilia ($p=0,051$ para os carcinomas foliculares e $p=0,061$ para os tumores foliculares de potencial incerto no estudo da associação entre oxifilia e rearranjo PAX8-PPAR γ).

A associação de mutação no gene RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ ocorreu em 3 carcinomas foliculares (11%) e 1 tumor folicular de potencial incerto de malignidade (8%), com e sem oxifilia (tabela 11).

A presença do rearranjo PAX8-PPAR γ nos carcinomas foliculares associou-se com menor idade média dos pacientes (38,6 versus 52,5 anos) e menor diâmetro tumoral (diâmetro médio de 3,9 versus 6,4 cm) (tabela 9). Nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade, tal rearranjo esteve associado a menor idade dos pacientes (idade média: 26,3 versus 50,0 anos) (tabela 10).

Figura 14 - *FISH*: Núcleo sem rearranjo PAX8-PPAR γ (esquerda) e com rearranjo (direita), indicado por seta

Tabela 11 – Relação entre diagnóstico histológico, oxifilia e rearranjo PAX8-PPAR γ nos carcinomas foliculares e nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade

DIAGNÓSTICO	OXIFILIA	REARRANJO PAX8-PPAR γ		PAX8-PPAR γ + RAS
		Sim	Não	
Carcinoma folicular (n=27)	Clássica (n=18)	4 (22,2%)	14 (77,8%)	1
	Parcial (n=4)	2 (50,0%)	2 (50,0%)	1
	Ausente (n=5)	4 (80,0%)	1 (20,0%)	1
TOTAL		10 (37,0%)	17 (63,0%)	3
Tumor folicular de potencial incerto de malignidade (n=12)	Clássica (n=6)	0	6 (100%)	0
	Parcial (n=1)	1 (100%)	0	1
	Ausente (n=5)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	0
	TOTAL	3 (25,0%)	9 (75,0%)	0

NOTA: Carcinoma folicular: associação entre oxifilia e rearranjo PAX8-PPAR γ : p=0,051. Tumor folicular de potencial incerto de malignidade: associação entre oxifilia e rearranjo PAX8-PPAR γ : p=0,061.

Tabela 12 - Comparação dos dados clínico-patológicos de carcinomas foliculares com e sem rearranjo *PAX8-PPAR γ*

	REARRANJO PAX8-PPAR γ		ESTATÍSTICA	p
	Presente	Ausente		
Número de casos	10	12		
Sexo F/M	9/1	9/3	$\chi^2=0,825$	0,364
Idade média (anos)	38,6	52,5	F=4,846	0,040
Tamanho médio (cm)	3,9	6,4	F=4,517	0,046
Invasão vascular	9	11	$\chi^2=0,018$	0,892
Invasão capsular	5	5	$\chi^2=0,153$	0,696
Invasão extra-tireoidea	0	2	$\chi^2=1,833$	0,176

Tabela 13 - Comparação dos dados clínico-patológicos dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade com e sem rearranjo *PAX8-PPAR γ* .

	REARRANJO PAX8-PPAR γ		ESTATÍSTICA	P
	Presente	Ausente		
Número de casos	3	6		
Sexo F/M	2/1	5/1	$\chi^2=0,321$	0,571
Idade média (anos)	26,3	50,0	F=7,683	0,028
Tamanho médio (cm)	4,2	3,7	F=0,084	0,781

5. DISCUSSÃO

5.1. Revisão morfológica de acordo com a classificação OMS/2004 e estudo imuno-histoquímico

Centrado na pesquisa de células de Hürthle, o presente estudo demonstrou a ocorrência deste padrão celular não só nos diversos tipos de neoplasia, mas também no bócio adenomatoso e na tireoidite crônica, favorecendo a proposta mais atual que descaracteriza as neoplasias de células de Hürthle como uma entidade independente (7, 9, 13, 20). As evidências clínico-patológicas e genéticas atualmente disponíveis indicam que todo tipo de neoplasia da tireóide pode ter sua variante oncocítica e levaram à substituição dos adenomas/carcinomas de células de Hürthle pelas variantes oncocíticas do adenoma, carcinoma papilífero, carcinoma folicular e carcinoma pouco diferenciado na recém publicada classificação da OMS dos tumores da tireóide (20). Os critérios diagnósticos destas variantes são os mesmos das neoplasias convencionais correspondentes (7, 9, 14, 20).

A utilização da nova classificação da OMS em nossa casuística de 205 nódulos da tireóide permitiu a identificação de neoplasias convencionais e suas respectivas variantes oncocíticas, realocando 13 casos como tumores foliculares de potencial incerto de malignidade (TFPIM). Os critérios essenciais para tal subdivisão, de casos anteriormente diagnosticados como carcinomas foliculares,

foram a não confirmação de invasão vascular ou capsular inequívocas em casos com alta celularidade, cápsula espessa e irregular, aspectos que, por sua vez, também distanciavam estes casos dos adenomas foliculares usuais. Foram estas mesmas questões diagnósticas que levaram à proposta do termo TFPIM para estas lesões por Williams et al (104), nomenclatura depois aceita pela classificação da OMS/2004 (20). Nossos achados confirmam uma dificuldade presente na prática diária dos patologistas e já relatada na literatura. Após revisão, apenas 34 a 62 % dos casos originalmente diagnosticados como carcinoma folicular permanece com o mesmo diagnóstico, o maior problema sendo a avaliação de invasão capsular (106).

Neste estudo, além de subdividir cada classe diagnóstica, detivemo-nos na análise da oxifilia: mais que categorizar as lesões em padrão convencional e variante oxifílica, também propusemos e relatamos a presença de um grupo intermediário, com oxifilia parcial, correspondente a aspecto apenas oncocitóide das células e/ou presença de células de Hürthle clássicas em menos de 75% da lesão, baseados no freqüente encontro deste tipo de lesão na nossa revisão e na dificuldade prática que pode surgir na avaliação morfológica da oxifilia. A oxifilia esteve presente em todos os subtipos de nódulos da tireóide, benignos e malignos: 20,7 a 69,7 % dos nódulos exibiram oxifilia clássica e 58,6 a 90,6 % oxifilia clássica ou parcial. Estes achados reforçam a hipótese de que a oxifilia e a tumorigênese possam ser eventos distintos, que podem ou não se associar, sendo esta uma das bases da nova classificação das lesões oncocíticas da tireóide .

A classificação das neoplasias oncocíticas nos grupos papilífero ou folicular foi baseada principalmente nos aspectos nucleares das células tumorais, segundo critérios da versão mais atual da classificação da OMS (20). Também nas lesões

com componente oxifílico parcial ou clássico, a detecção imuno-histoquímica de marcadores pode ser útil no diagnóstico diferencial de casos difíceis, com as mesmas ressalvas dos tumores convencionais (7, 100, 102, 107-110). Têm sido utilizados na literatura vários marcadores como HBME-1, galectina-3, galectina-7, citoqueratina 19, ret, sialyl-Lewis X, proteína S-100, p27Kp1, Rb, entre outros, na tentativa de caracterizar malignidade, principalmente nas neoplasias foliculares, e no diagnóstico do carcinoma papilífero quando as características nucleares e arquiteturais não são típicas (100-103, 111, 112). Nas lesões foliculares, detivemo-nos no estudo da cápsula tumoral nos diversos cortes histológicos, em busca de áreas de invasão capsular e/ou vascular que caracterizassem definitivamente malignidade. Por outro lado, mesmo após estudo histológico cuidadoso ainda pode persistir dificuldade no diagnóstico diferencial entre neoplasia folicular e variante folicular do carcinoma papilífero, o que tem sido relatado nos melhores centros de patologia de tireóide do mundo. Em estudo recente, com revisão de 87 casos de tumores com aspectos variáveis da variante folicular do carcinoma papilífero por 10 patologistas especializados em tireóide, houve concordância no diagnóstico entre os patologistas em 39% dos casos em geral e 66,7% dos casos com doença metastática (113). Estes achados confirmam uma real dificuldade diagnóstica, motivando-nos a realizar o estudo da CK19 em nossos casos para verificar como sua imuno-expressão se comportaria nos tumores oxifílicos e convencionais, contribuindo ou não para o diagnóstico dos carcinomas papilíferos. A CK19 é um dos marcadores mais utilizados nos carcinomas papilíferos, com marcação frequentemente forte e difusa, mas não específica, podendo ser focalmente evidenciado com menor intensidade nas neoplasias foliculares. Associado à morfologia, tem se mostrado, na nossa

experiência, um bom auxiliar na confirmação do diagnóstico de carcinoma papilífero, como relatado na literatura (100, 101, 107, 108, 111, 114-116). Por estes motivos a CK 19 foi escolhida para estudo em nossa casuística, com achado de associação significativa entre o diagnóstico de carcinoma papilífero e expressão da CK 19 ($p < 0.001$), tanto nos tumores convencionais quanto oxifílicos, sem associação estatisticamente significativa entre os graus de oxifilia e expressão da CK 19 ($p = 0,188$). Houve imuno-expressão intensa para CK19 em 59% dos carcinomas papilíferos, em apenas um caso de carcinoma pouco diferenciado e em uma área de um carcinoma folicular que retrospectivamente já poderia ser considerada em transformação para carcinoma pouco diferenciado. Não se observou expressão forte da CK 19 nos demais nódulos, havendo portanto boa concordância entre nossos diagnósticos histológicos e a imuno-expressão da CK 19. A CK 19 foi também focalmente positiva na tireóide adjacente, em casos com tireoidite crônica linfocitária, que, de maneira interessante, muitas vezes já apresenta alterações nucleares encontradas no carcinoma papilífero e mesmo mutações no RET/PTC, ainda sem formação de neoplasia (44, 117).

A oxifilia pôde ser bem avaliada apenas pela microscopia convencional na maior parte dos casos. Chu e Weiss, em seu trabalho de revisão sobre expressão de citoqueratinas em tecidos normais e neoplasias (21), citam a citoqueratina 14 (CK14) como um marcador de células oncocíticas. Os mesmos autores, em outro estudo de tumores oncocíticos em diversos órgãos, confirmaram positividade da CK 14 em todos os 30 tumores estudados, incluindo 6 adenomas e 3 carcinomas de células de Hürthle (23). No nosso estudo, a CK14 não colaborou para a avaliação da oxifilia na nossa casuística, mesmo com controles positivos e negativos e adequada preservação

tecidual. Questões técnicas podem estar associadas a esta ausência de reatividade em nossa casuística: como o tecido foi processado de modo convencional com fixação em formol, processamento em auto-técnico até inclusão em parafina, cortes e reação imuno-histoquímica com amplificação pelo sistema envision, e todas as demais pesquisas demonstraram-se adequadas, surgiu a hipótese de problemas relacionados ao anticorpo monoclonal aqui usado. Como os controles positivos das reações mostraram resultado adequado e houve reatividade focal do marcador em um caso estudado, a quase ausência de reatividade para citoqueratina 14 no presente material permanece inexplicada.

Neste estudo, introduzimos o anticorpo anti-citocromo-oxidase como um auxiliar na avaliação da oxifilia, indiretamente evidenciada pela expressão desta enzima do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial. Este anticorpo já havia sido utilizado na literatura na marcação de células oncocíticas na tireoidite de Hashimoto (25) e na adenohipófise (118). Houve associação estatisticamente significativa entre a expressão deste marcador e oxifilia histológica nos bócios adenomatosos, adenomas foliculares e carcinomas foliculares, mas não nos outros tipos de nódulo. Provavelmente nas outras lesões o aspecto histológico de oxifilia é mais difícil de avaliar morfológicamente e/ou nem sempre se correlaciona com atividade da citocromo-oxidase. Nos carcinomas papilíferos, a presença de citoqueratina em grande quantidade (confirmada pela exuberante expressão da CK 19) pode simular oxifilia na microscopia tradicional. Encontramos positividade focal da citocromo-oxidase na tireóide adjacente aos tumores, principalmente em áreas de tireoidite crônica linfocitária e também em bócio adenomatoso, indicando um provável aumento da expressão desta enzima nestas condições.

5.2. Oxifilia e dados clínico-patológicos

Analisando os padrões de oxifilia conforme dados clínico-patológicos, observamos que a oxifilia ausente ou parcial nos carcinomas papilíferos associou-se a maior frequência de multicentricidade em comparação com os carcinomas oxifílicos. Há indícios de que a multicentricidade nos carcinomas papilíferos corresponda a tumores independentes e não a disseminação linfática intra-glandular de um único tumor, com diferentes rearranjos RET/PTC e origem clonal independente (119-121). A oxifilia teria então de surgir de modo independente em cada foco, ajudando a explicar nosso achado de maior frequência de oxifilia ausente ou parcial nestes tumores; o tipo oxifílico apresentou menor incidência de multicentricidade. Os carcinomas papilíferos oncocíticos foram observados em pacientes com maior idade média, sugerindo que a oxifilia possa ser mesmo progressiva com a idade do paciente, devido ao acúmulo de mutações e proliferação das mitocôndrias com o passar do tempo (8, 9, 11).

Um achado importante do presente estudo foi a diferente distribuição da oxifilia nas neoplasias foliculares: a maior parte dos carcinomas foliculares exibia oxifilia clássica, configurando os tradicionais carcinomas de células de Hürthle e confirmando o dado já relatado em publicações prévias de maior incidência de malignidade nos tumores de células de Hürthle (7, 9, 83, 122-124). Seguiu-se, em frequência de oxifilia, o grupo intermediário dos “tumores foliculares de potencial incerto de malignidade”, sendo os adenomas foliculares os menos associados a oxifilia clássica ou parcial. Nos carcinomas foliculares e tumores foliculares de

potencial incerto de malignidade não se observou correlação entre oxifilia e as variáveis clinico-patológicas analisadas.

5.3. Oxifilia e rearranjo PAX8-PPAR γ e mutações nos genes RAS e BRAF

Estudos recentes de mutações de diversos genes relacionados às neoplasias da tireóide (BRAF, RET/PTC, PAX8-PPAR γ) têm detectado a presença de mutações nas neoplasias convencionais e nas neoplasias oncocíticas correspondentes (14, 51, 62, 63, 80, 82, 125), ajudando a subdividir o grupo das neoplasias de células de Hürthle em variantes oncocíticas dos diversos tumores. Na nossa casuística atual, o rearranjo PAX8-PPAR γ esteve presente em 37,0% dos carcinomas foliculares e em 25,0% dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade, estando ausente apenas no grupo dos tumores foliculares de potencial incerto com oxifilia clássica. Na literatura a frequência deste rearranjo nos carcinomas foliculares, em estudos utilizando em geral RT-PCR e FISH, varia de 29% a 56%, estando nossa casuística de acordo com estes dados (51, 77, 78). O estudo da frequência do rearranjo PAX8-PPAR γ nos recém descritos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade, foi aqui efetuado de modo original, mas o pequeno contingente de casos que receberam esta classificação impede análise mais conclusiva, requerendo estudos adicionais em maiores séries destes “tumores de potencial incerto”. O rearranjo foi menos frequente nos carcinomas foliculares com oxifilia clássica e parcial (22,2% e 50% dos casos), quando comparados com os respectivos tumores convencionais

(presente em 80% dos casos), mas sua incidência nos carcinomas foliculares oncocíticos clássicos (22,2%) foi bem acima do relatado na literatura (0-4%) (51, 81, 82), utilizando metodologia adequada: FISH e RT-PCR. Não foram encontrados estudos prévios associando o rearranjo PAX8-PPAR γ com o que chamamos aqui de oxifilia parcial, para comparação de resultados.

O rearranjo PAX8-PPAR γ inicialmente não havia sido encontrado em neoplasias foliculares oncocíticas, favorecendo que estas pudessem realmente ser uma entidade (80). Este rearranjo foi posteriormente identificado nestas neoplasias com frequência de 3% (1 em 30 casos) a 4% (1 em 23 casos) (51, 81, 82), abalando novamente este conceito. Na nossa casuística encontramos o rearranjo PAX8-PPAR γ em ainda maior frequência: 22,2 % dos carcinomas oncocíticos, permanecendo inexplicado este achado no nosso material. A presença deste rearranjo, no presente trabalho, mostrou-se associada com menor idade média dos pacientes nos carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade e nos carcinomas foliculares também se associou a menor diâmetro tumoral, como já relatado em outros estudos (51, 65).

As mutações do gene RAS observadas (H-RAS e N-RAS) estiveram presentes em 22,2% dos carcinomas foliculares e 33,3% dos tumores foliculares de potencial incerto. Os achados similares nos dois grupos de neoplasia sugerem que esta alteração genética possivelmente não seja essencial para invasão vascular ou capsular nas neoplasias foliculares. O papel das mutações do RAS nos tumores da tireóide permanece no entanto mal definido (126). Um estudo de 125 carcinomas da tireóide mostrou associação de mutação no RAS com tumores pouco diferenciados ou indiferenciados e com progressão tumoral e comportamento clínico agressivo nos

carcinomas bem diferenciados (127). O achado de frequência similar destas mutações nos adenomas (48%) e carcinomas foliculares convencionais (49%), em uma análise de 88 casos de tumores foliculares convencionais e oxifílicos (51) sugere por outro lado que a ativação do RAS possa ser um evento precoce, insuficiente para determinar malignidade nestes tumores. Na mesma casuística, apenas 1 (8%) dos adenomas oncocíticos e 2 (11%) dos carcinomas foliculares oncocíticos apresentaram mutações do RAS. As mutações no RAS foram também menos frequentes nos carcinomas foliculares oncocíticos clássicos da nossa casuística. A presença de mutação do RAS nos carcinomas foliculares teve associação significativa com invasão capsular ($p=0,030$), um dos critérios de malignidade utilizados no seu diagnóstico, e com o achado de oxifilia parcial ($p=0.021$). Ocorreu com igual frequência nos tumores foliculares de potencial incerto oncocíticos e convencionais, embora o número de casos com mutação neste grupo tenha sido pequeno, não permitindo conclusão definitiva.

Nossos casos de carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade fizeram parte de um estudo multi-institucional, que comparou os aspectos moleculares observados em nossos 39 casos com 40 casos da variante folicular do carcinoma papilífero, encontrando frequência similar do rearranjo PAX8-PPAR γ e das mutações do RAS nos dois grupos de lesão, sugerindo que um subgrupo dos carcinomas papilíferos variante folicular possa estar relacionado com os carcinomas foliculares, pelo menos do ponto de vista molecular (65).

Como relatado na literatura (14, 58, 128), encontramos mutação no gene BRAF (V600E) apenas nos carcinomas papilíferos e em nenhum carcinoma folicular ou tumor folicular de potencial incerto de malignidade. Tal pesquisa genética,

aplicável a amostras convencionalmente fixadas e incluídas em parafina, pode se tornar valioso instrumento no diagnóstico diferencial de casos limítrofes não solucionados pela morfologia e por métodos imuno-histoquímicos. Especialmente considerando que as mutações no gene BRAF e os rearranjos RET/PTC são eventos alternativos na etiopatogênese dos carcinomas papilíferos, (14, 52, 129), os dois eventos moleculares podem ser avaliados em casos de difícil diagnóstico. Mutações no gene BRAF foram menos frequentes nos carcinomas papilíferos oncocíticos. Sua presença não teve influência nas variáveis clínico-patológicas estudadas nesta casuística (sexo, gênero, idade, diâmetro do tumor, invasão vascular, extensão extra-tireoidea, multicentricidade e metástase ganglionar). O mesmo ocorreu em outra série com 72 tumores da tireóide, incluindo 60 carcinomas papilíferos (128), sugerindo que esta mutação esteja envolvida na tumorigênese mas não na progressão da doença. Outro estudo, no entanto, avaliando 207 tumores, demonstrou que a mutação no gene BRAF se correlacionou significativamente com metástases à distância e estadiamento clínico mas avançado da doença (66). Permanece controverso o valor prognóstico da mutação no BRAF (V600E) (14). Em outro estudo que conduzimos como parte desta linha de pesquisa e agora já publicado, incluindo estes casos e formando maior casuística (315 tumores em 280 pacientes), encontramos associação entre a mutação do BRAF (V600E) e maior idade média dos pacientes (62), a qual por si só já é um fator de mau prognóstico nas neoplasias da tireóide (106). Por outro lado, os casos com a mutação foram menos frequentemente multicêntricos e menos angioinvasivos do que os casos sem a mutação. Outros estudos, com séries grandes e maior seguimento, são necessários para esclarecer

melhor o significado prognóstico da mutação do gene BRAF no carcinoma papilífero.

A associação entre a mutação no gene BRAF observada em nosso estudo (V600E) e o subtipo histológico do carcinomas papilífero foi já relatada por nós, como parte de um outro estudo multi-institucional (63). Naquela análise de 124 carcinomas papilíferos, encontramos a mutação BRAF (V600E), anteriormente chamada BRAF (V599E), em 45 casos (36%). Demonstramos que esta mutação é quase exclusivamente encontrada em carcinomas papilíferos com padrão de crescimento papilar ou misto papilar-folicular, com frequência similar nos carcinomas oncocíticos (54%) e convencionais (53%). Não foi evidenciada na variante folicular. Esta associação entre padrão histológico e mutação do gene BRAF pode ajudar a explicar as diferentes frequências da mutação BRAF (V600E) nas séries da literatura (36-69%) (52, 59, 63).

Mutação no gene BRAF foi encontrada em um carcinoma pouco diferenciado e em nenhum dos carcinomas anaplásicos, mas este resultado deixa de ser conclusivo devido ao pequeno número destes tumores na nossa atual casuística. Outro estudo multi-institucional de que participamos com nossos casos (64), com análise de 19 carcinomas pouco diferenciados e 17 carcinomas anaplásicos da tireóide, evidenciou que a mutação no gene BRAF (V600E) ocorreu em seis dos carcinomas anaplásicos (35%) e em nenhum dos carcinomas pouco diferenciados. Este achado sugere que os seis carcinomas anaplásicos com mutações no gene BRAF tenham se originado em carcinomas papilíferos com a mesma mutação. No grupo dos carcinomas pouco diferenciados haviam sido previamente excluídos todos os carcinomas pouco diferenciados que coexistiam com carcinomas papilíferos ou que tinham núcleos de

carcinoma papilífero. Se acrescentarmos os carcinomas pouco diferenciados com núcleos do tipo papilífero também há casos com mutações do BRAF, como ocorreu em nossa casuística. Já o rearranjo RET/PTC é detectado apenas em carcinomas papilíferos bem diferenciados (14, 48, 49).

Nossos resultados indicam que a oxifilia é muito freqüente em nódulos da tireóide, especialmente quando se considera também a oxifilia parcial, inclusive na nova entidade dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade. Apenas nas neoplasias foliculares confirmamos associação entre oxifilia e maior incidência de malignidade. Nos carcinomas papilíferos, os oxifílicos tiveram menor incidência de multicentricidade. Embora a oxifilia tenha sido associada com menor freqüência de mutações nos genes BRAF e RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ , ela pode coexistir com estas mutações e ocorre também com alta freqüência em adenomas foliculares e no bócio adenomatoso, favorecendo a possibilidade de que a oxifilia e a tumorigênese possam ser eventos distintos, muitas vezes paralelos. No entanto, não se sabe ainda com certeza a relação entre as mutações mitocondriais e a tumorigênese, já que a biologia das mitocôndrias sugere que possa haver alguma relação (14, 28, 31, 35, 37). Interessantemente, a própria transformação neoplásica leva em algum momento a maior produção de *ROS* (*reactive oxygen species*), que danifica e acelera a taxa de mutação do DNA mitocondrial (130). Vários estudos, em diversos órgãos (incluindo próstata, mama, cólon, pele, pulmão, fígado, esôfago e cabeça e pescoço), continuam sendo feitos tentando esclarecer se há relação causal ou não entre as alterações do DNA mitocondrial e a carcinogênese e investigando o eventual uso destas mutações como marcadores para detecção precoce do câncer (130-133).

Esperamos que a aplicação prática em todo o mundo da nova classificação das neoplasias oncocíticas da tireóide (OMS, 2004) garanta sua validação e demonstre possível correlação com a evolução clínica dos pacientes. Apesar de ser reconhecida a existência de neoplasias oncocíticas benignas, permanece válido o conceito de que as neoplasias de células de Hürthle apresentam maior incidência de malignidade, especialmente nos tumores de maior diâmetro (7, 9, 83, 122-124). O pior prognóstico atribuído aos tumores com células de Hürthle aparentemente não se confirma se os casos são comparados com tumores semelhantes não oncocíticos com mesmo estadiamento e pode estar relacionado com a menor eficiência das células de Hürthle na captação de iodo e síntese hormonal, dificultando seu seguimento clínico e resposta ao tratamento com iodo radiativo (7, 11, 14, 17, 22, 96, 124, 134, 135), e não a uma maior malignidade intrínseca destes tumores. As mutações no DNA mitocondrial a princípio poderiam contribuir para a transformação neoplásica, modificando o metabolismo celular e/ou modulando a apoptose, mas parece paradoxal associar o desenvolvimento de neoplasia com anormalidades na organela envolvida no fornecimento de energia celular. O mesmo raciocínio se aplica ao possível papel destas mitocôndrias anormais na evolução das neoplasias oncocíticas, ao tentar explicar como células contendo numerosas mitocôndrias anormais poderiam ser paradoxalmente mais agressivas (11).

Novos estudos futuros serão necessários para consolidar esta nova abordagem dos tumores oncocíticos, não mais como a entidade única tumores de células de Hürthle, mas como um subtipo de cada lesão da tireóide. Será importante verificar se a longo prazo o perfil molecular destes tumores permanecerá semelhante ao das neoplasias convencionais correspondentes.

Não se sabe também se há significado na presença de menos de 75 % de células de Hürthle em uma neoplasia. Nosso estudo evidenciou esta chamada oxifilia parcial em 36,6% dos nódulos estudados, que somados aos 37,6% dos nódulos com oxifilia clássica correspondem à presença de algum grau de oxifilia em 74,2% das lesões. Um achado tão freqüente nos nódulos, e evidenciado inclusive na tireoidite, não parece ter um papel significativo na carcinogênese, já que apenas 5% dos nódulos da tireóide são malignos. No entanto, as lesões oncocíticas da tireóide ainda são polêmicas e precisam ser mais estudadas para investigação do real papel da oxifilia em sua etiopatogênese, comportamento clínico e prognóstico .

6. CONCLUSÕES

- No presente trabalho, a oxifilia ocorreu em todos os tipos de nódulos da tireóide, inclusive na nova entidade dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade. De modo especial, tanto sua apresentação “clássica” como “parcial” mostraram-se significativamente mais freqüentes nos carcinomas foliculares, sendo intermediárias nos “tumores foliculares de potencial incerto” e menos freqüentes nos adenomas.
- Ainda que a identificação da oxifilia fundamente-se no estudo histológico tradicional, a imunorreatividade para a enzima mitocondrial citocromo-oxidase definiu com clareza sua presença, havendo associação estatisticamente significativa entre a expressão deste marcador e oxifilia histológica nos bócios adenomatosos, adenomas foliculares e carcinomas foliculares, mas não nos outros tipos de nódulos.
- A imuno-expressão acentuada da CK 19 foi achado virtualmente exclusivo dos carcinomas papilíferos, corroborando prévias sugestões de seu uso auxiliar em lesões com apenas alguns dos quesitos nucleares para tal categoria diagnóstica.

- Revisão rigorosa conforme os novos critérios da OMS / 2004 demonstrou que há situações em que se torna necessário o uso criterioso da categoria intermediária de “tumores foliculares de potencial incerto de malignidade”.
- A detecção da mutação no gene BRAF (V600E) apenas nos carcinomas papilíferos e quase exclusivamente nos subtipos com padrão de crescimento papilar ou misto papilar-folicular corrobora prévios relatos da diferente via carcinogenética destas neoplasias. Constatamos agora, de modo original, que sua presença não sofreu influência da oxifilia e não teve repercussão sobre as variáveis clínico-patológicas estudadas nesta casuística.
- O rearranjo PAX8-PPAR γ foi identificado nos carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade. Mostrou-se associado com menor idade média dos pacientes nos dois grupos de tumores e com menor diâmetro tumoral nos carcinomas foliculares. Sua presença nos carcinomas foliculares oncocíticos clássicos (22,2%) foi bem maior do que a relatada previamente na literatura (0-4%), fato cujo esclarecimento requer estudos futuros.
- As mutações do gene RAS (H-RAS e N-RAS) observadas nos carcinomas foliculares mostraram-se associadas a invasão capsular e a oxifilia parcial. Seu achado com frequência semelhante nos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade requer futuros estudos em maior casuística, especialmente para análise de sua distribuição quanto aos graus de oxifilia.

- O rearranjo PAX8-PPAR γ e as mutações do RAS não foram, na nossa casuística, características que poderiam ajudar na individualização dos carcinomas foliculares e dos tumores foliculares de potencial incerto de malignidade.
- Ainda que menos freqüentes, diversos casos de neoplasias oxifílicas apresentaram mutações nos genes BRAF e RAS e rearranjo PAX8-PPAR γ . Este achado, considerando também a presença freqüente de oxifilia em todos os subtipos de nódulos, favorece a hipótese de que a tumorigênese e a oxifilia possam ser eventos independentes na tireóide.

7. ANEXOS

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
13-0854-8	Carcinoma folicular variante oncocítica extensamente invasivo	clássica	+	+	-	-	-	-	-	-	+++	++
16-8354-3	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	+	+	-	-	-	-	++++	++++	++++	++
16-8968-1	Carcinoma papilífero variante folicular oncocítico	clássica	+	+	-	-	-	-	++	+++	NR	NR
17-5051-8	Adenoma folicular	ausente	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
17-5300-2	Bócio adenomatoso	clássica	++	+	-	-	-	-	++	+++	+	+
17-6116-1	Carcinoma papilífero <i>Warthin-like</i>	clássica	++++	++++	-	-	-	-	++++	+	+++	+
18-2862-2	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	+++	NR	NR	-	-	++	+++	NR	NR
19-7378-9	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-1812-2	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-
21-2057-7	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	+	++	+	+
21-7613-0	Carcinoma papilífero variante folicular	parcial	+++	+++	-	-	-	-	+	++	NR	NR
22-0097-0	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	++	++	+++	+
23-0002-8	Carcinoma papilífero variante folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	++++	+	+
23-4968-0	Carcinoma papilífero clássico	parcial	++	+++	NR	NR	-	-	+++	+++	NR	NR
23-5796-8	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	-	-
24-1016-8	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+
24-2343-0	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	+	+
24-3178-5	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
24-8781-0	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+	+	-	-	-	-	+++	++	-	-
25-6056-9	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	++	+
25-8842-0	Adenoma folicular	parcial	-	-	NR	NR	-	-	-	-	NR	NR
25-9322-0	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	++	++++	+	+
26-5917-4	Carcinoma papilífero clássico	ausente	+	+	-	-	-	-	+++	++++	++	++

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
26-7430-0	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	+
28-1266-5	Carcinoma papilífero clássico	parcial	-	-	-	-	-	-	++	++++	++	+
28-1976-7	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	+	++	+
28-2008-0	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	+	+
28-2308-0	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	++	NR	NR
28-3850-8	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
28-7410-5	Bócio adenomatoso	ausente	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
28-9232-4	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29-0378-4	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
29-0425-0	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
29-0495-0	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
29-0946-4	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29-7000-7	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	+	+
30-6059-4	Carcinoma anaplásico fusocelular e de células gigantes	parcial	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
30-8410-8	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	-	-	NR	NR	-	-	++	++	NR	NR
31-0445-4	Bócio adenomatoso	ausente	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
31-4892-6	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	+	+
32-0600-9	Carcinoma folicular minimamente invasivo	parcial	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+
32-7616-3	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	-	-
33-0897-5	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	+
33-1892-3	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	NR	NR	-	-	+++	++	NR	NR
33-1893-1	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	++	+++	+	+
33-2667-5	Adenoma folicular	ausente	-	-	NR	NR	-	-	++	++	NR	NR
33-6997-8	Carcinoma folicular variante oncocítica extensamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
33-8114-5	Microcarcinoma papilífero variante folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	++	+	NR	NR
33-8624-4	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	++++	+++	++	++
33-9478-6	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33-9581-2	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	NR	NR	-	-	+++	++++	-	-
33-9689-4	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR
34-0193-6	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34-0316-5	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
34-2263-1	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++	+++	++
34-2332-8	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	+++	-	-
34-2443-0	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
34-3295-5	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR
34-6305-2	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34-6530-6	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
34-7552-2	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
35-2357-8	Bócio adenomatoso	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35-3600-9	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35-4830-9	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	NR	NR	-	-	++	+++	NR	NR
35-5516-0	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	++++	-	-
35-6266-2	Carcinoma folicular variante oncocítica extensamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	-	-
35-9991-4	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-
36-0353-9	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+
36-0722-4	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
36-1998-2	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
36-2000-0	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36-5020-0	Adenoma folicular	parcial	+	+++	-	-	-	-	++	+++	++	+
36-6944-0	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-
36-8631-0	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-
36-9293-0	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37-1544-2	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	+
37-3655-5	Carcinoma papilífero clássico	ausente	-	-	NR	NR	-	-	++	+++	NR	NR
37-4170-2	Bócio adenomatoso	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37-7758-8	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-
37-8388-0	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-
38-1798-5	Microcarcinoma papilífero clássico	ausente	++	++	-	-	-	-	+	+	+++	+
38-2258-3	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-3527-8	Carcinoma papilífero variante folicular oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-3699-1	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-4092-1	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	+	+	-	-	-	-	+++	++++	-	-
38-7550-4	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-
38-9242-5	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo com necrose extensa	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-
39-1494-1	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-
39-1767-3	Carcinoma folicular extensamente invasivo	ausente	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
39-2928-0	Carcinoma papilífero variante folicular	parcial	+++	++++	-	-	-	-	++	++++	++	+
39-3144-7	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
39-4206-6	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-
39-4746-7	Carcinoma papilífero clássico	parcial	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
39-5413-7	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	+++	+++	-	-	-	-	+	+	-	-
39-6275-0	Carcinoma papilífero clássico oncocítico	clássica	++	++	NR	NR	-	-	+	+	NR	NR
39-7351-4	Carcinoma pouco diferenciado associado a carcinoma papilífero	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39-7360-3	Carcinoma papilífero variante de células claras	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40-1040-0	Carcinoma papilífero variante folicular	parcial	+++	++	-	-	-	-	+	+	-	-
40-2430-3	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40-2836-8	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40-4383-9	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40-5194-7	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	+	++	+	+
40-5603-5	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40-6555-7	Carcinoma papilífero clássico + <i>Warthin-like</i>	clássica	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
40-7017-8	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
40-8066-1	Carcinoma papilífero clássico	parcial	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
40-9087-0	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-3800-7	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
41-4623-9	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-5945-4	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-7697-9	Microcarcinoma papilífero clássico	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-9873-5	Carcinoma papilífero clássico	ausente	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
42-0251-1	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
42-0483-2	Microcarcinoma papilífero clássico	parcial	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
42-0489-1	Bócio adenomatoso	clássica	+	+	-	-	-	-	+	++	-	-
42-0738-6	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+	++++	-	-
42-1286-0	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	++	-	-	-	-	+	+	NR	NR
42-7507-1	Carcinoma papilífero clássico	ausente	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	++
42-8340-6	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	+	++
43-0004-1	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+	++	+	++
43-1092-6	Carcinoma papilífero clássico	ausente	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
43-1798-0	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	++	-	-	-	-	+	+	-	-
43-2052-2	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
43-2740-3	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43-3971-1	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-
43-5789-2	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-
43-8088-6	Carcinoma pouco diferenciado / anaplásico	ausente	+++	++++	-	-	-	-	++	++	NR	NR
43-8467-9	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	++	-	-	-	-	+++	+++	-	-
43-8675-2	Carcinoma papilífero variante folicular oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
43-9416-0	Carcinoma papilífero clássico	ausente	++	+	-	-	-	-	+	+	+	+
44-2257-0	Carcinoma anaplásico fusocelular	ausente	-	-	NR	NR	-	-	++	++	NR	NR
44-2859-5	Adenoma folicular variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++	++++	-	-
44-3674-1	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++++	-	-
44-4064-1	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44-5689-0	Carcinoma papilífero clássico	ausente	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
44-8728-1	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-
45-1310-0	Carcinoma pouco diferenciado variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
45-6879-6	Carcinoma folicular minimamente invasivo	parcial	++	++	-	-	-	-	++	++	-	-
45-7959-3	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	++	-	-	-	-	++	++	-	-
45-8144-0	Carcinoma papilífero clássico com componente do tipo fascíte nodular	parcial	+++	+++	NR	NR	-	-	+	++	-	-
45-8368-0	Carcinoma papilífero clássico	parcial	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
45-9700-1	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46-2017-8	Carcinoma papilífero clássico	parcial	+++	+++	-	-	-	-	++	++	-	-
46-7121-0	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
46-7611-4	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	++++	++	++
46-8043-0	Carcinoma pouco diferenciado	parcial	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
47-0318-9	Bócio adenomatoso + microcarcinoma papilífero	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	++	++++	++
47-0537-8	Carcinoma papilífero clássico + variante folicular + Warthin-like	total	++++	++++	-	-	-	-	+++	++	+++	++
47-4086-6	Carcinoma papilífero variante folicular	parcial	++++	+++	NR	NR	-	-	++	+++	NR	NR
47-5406-9	Carcinoma papilífero clássico	parcial	++++	++++	-	-	-	-	+++	++	-	-
47-5427-1	Carcinoma papilífero clássico	parcial	++++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
47-7483-3	Carcinoma papilífero clássico + variante folicular	parcial	+++	+++	-	-	-	-	+++	++	-	-
47-8386-7	Adenoma folicular	parcial	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
47-8697-1	Adenoma folicular	ausente	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
47-9747-7	Microcarcinoma papilífero variante folicular	parcial	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
48-3772-0	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48-5079-3	Microcarcinoma papilífero variante <i>Warthin-like</i>	clássica	++++	++++	++	+	-	-	-	-	++++	++
48-7441-2	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-
48-8303-9	Carcinoma papilífero clássico	ausente	+++	++	-	-	-	-	++	+	NR	NR
49-0144-4	Adenoma folicular + microcarcinoma papilífero clássico	parcial	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
49-3164-5	Carcinoma folicular extensamente invasivo	parcial	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-
49-5435-1	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-
49-6062-9	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
49-6483-7	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49-6588-4	Carcinoma papilífero Warthin-like	parcial	++++	++++	-	-	-	-	++	++	-	-
49-6823-9	Carcinoma papilífero variante folicular	ausente	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
49-8998-8	Microcarcinoma papilífero clássico	ausente	+++	+++	-	-	-	-	+	+	-	-
49-9206-7	Carcinoma papilífero clássico + variante folicular	parcial	++++	++++	++	+	-	-	+++	+++	-	-
49-9410-8	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-
50-0307-5	Microcarcinoma papilífero variante folicular	ausente	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
50-2434-0	Carcinoma papilífero variante folicular oncocítica	clássica	++	+	-	-	-	-	++	+++	-	-
50-2853-1	Adenoma folicular	parcial	-	-	NR	NR	-	-	-	-	-	-
50-3922-3	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	++++	+++	++	++
50-3931-2	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-
50-3948-7	Carcinoma papilífero Warthin-like	clássica	++++	++++	+++	+	-	-	+	+	++++	++
50-4206-2	Carcinoma papilífero variante folicular	ausente	-	-	NR	NR	-	-	-	-	NR	NR
50-7374-0	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	--	-	-	-	-	-	--	-	-
50-7700-1	Carcinoma papilífero clássico	parcial	++++	+++	NR	NR	-	-	+++	+++	NR	NR
50-8151-3	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	parcial	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
50-9684-7	Bócio adenomatoso + carcinoma papilífero	clássica	+++	++	--	--	-	-	+	++	--	--
51-1373-3	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
51-2245-7	Bócio adenomatoso	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51-2601-0	Carcinoma papilífero Warthin-like	clássica	++++	++++	-	-	-	-	+++	+++	-	-
51-3568-0	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+
51-4676-3	Bócio adenomatoso	clássica	++	+	-	-	-	-	++++	++++	-	-
51-5799-4	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++
51-6731-0	Bócio adenomatoso	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR
51-7788-0	Carcinoma papilífero clássico	ausente	+++	++++	-	-	-	-	+++	+	+++	+
51-8240-9	Carcinoma folicular minimamente invasivo	parcial	+	++	-	-	-	-	+	+	-	-
51-9702-3	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	++	+	-	-	-	-	++	++	-	-
51-9954-9	Microcarcinoma papilífero clássico + variante folicular	ausente	+++	++++	-	-	-	-	+	+	+	+
52-2349-0	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52-2558-2	Adenoma folicular	parcial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52-6141-4	Bócio adenomatoso + carcinoma papilífero	clássica	+++	++	-	-	-	-	++++	+++	+	-
52-8242-0	Carcinoma pouco diferenciado variante oncocítica	clássica	+	++	NR	NR	-	-	-	-	NR	NR
53-4715-7	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
53-6661-5	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	NR	NR	-	-	++++	++	NR	NR
53-7255-0	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-
53-7268-2	Adenoma folicular	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53-8301-3	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-
54-1481-4	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54-5082-9	Bócio adenomatoso	clássica	-	-	-	-	-	-	+	++++	-	-
54-7614-3	Carcinoma folicular extensamente invasivo	parcial	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-

“continua”

Anexo A - Diagnóstico histológico, oxifilia e resultado das reações imuno-histoquímicas “continuação”

EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	CK 19 IN	CK 19 DN	CK 19 IT	CK 19 DT	CK 14 IN	CK 14 DN	CO IN	CO DN	CO IT	CO DT
55-3380-5	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	-	NR	NR	-	-	+++	+++	NR	NR
56-2607-2	Carcinoma papilífero variante folicular oncocítica	clássica	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-

“conclusão”

NR: não realizado (sem representação na lâmina selecionada)

CO: citocromo-oxidase

IN: intensidade no nódulo

DN: distribuição no nódulo

IT: intensidade na tireóide adjacente

DT: distribuição na tireóide adjacente

Anexo B - Carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade: oxifilia, dados clínico-patológicos e alterações genéticas

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	DIÂMETRO (CM)	INVASÃO VASCULAR	INVASÃO CAPSULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	METÁSTASE	TIREÓIDE ADJACENTE	REARRANJO PAX8-PPAR γ	MUTAÇÃO RAS
13-0854-8	f	59	Carcinoma folicular variante oncocítica extensamente invasivo	clássica	-	sim	sim	sim	sim	sem alterações	não estudado	não estudado
23-5796-8	f	61	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	6.5	não	não	não	não	bócio adenomatoso com e sem oxifilia	não estudado	não estudado
25-9322-0	f	19	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	2.2	sim	sim	não	não	bócio adenomatoso sem oxifilia	sim	não
26-7430-0	f	54	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	3	sim	não	não	não	tireoidite crônica linfocitária + bócio adenomatoso com oxifilia	sim	não
28-2008-0	f	75	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	7.5	sim	não	sim	não	bócio adenomatoso com e sem oxifilia	não estudado	Não
29-0425-0	f	25	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	3.5	não	não	não	não	sem alterações	sim	HRAS Q61R
30-8410-8	m	50	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	4	não	não	não	não	sem alterações	não	não

“continua”

Anexo B - Carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade: oxifilia, dados clínico-patológicos e alterações genéticas “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	DIÂMETRO (CM)	INVASÃO VASCULAR	INVASÃO CAPSULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	METÁSTASE	TIREÓIDE ADJACENTE	REARRANJO PAX8-PPAR γ	MUTAÇÃO RAS
32-0600-9	f	54	Carcinoma folicular minimamente invasivo	parcial	5.1	sim	sim	não	não	bócio adenomatoso com oxifilia parcial	não	HRASQ61R
33-6997-8	f	86	Carcinoma folicular variante oncocítica extensamente invasivo	clássica	12	não	sim	não	não	bócio adenomatoso sem oxifilia	não estudado	não
33-9581-2	f	48	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	0.8	sim	sim	não	não	sem alterações	não estudado	Não
33-9689-4	m	36	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	4	não	sim	não	não	sem alterações	não	NRASQ61G
34-0193-6	f	37	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	4.5	sim	não	não	não	sem alterações	sim	não
35-6266-2	m	77	Carcinoma folicular variante oncocítica extensamente invasivo	clássica	12	sim	não	sim	não	bócio adenomatoso sem oxifilia	não	não
36-9293-0	f	23	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	1	sim	não	não	não	tireoidite de Hashimoto + bócio adenomatoso com oxifilia clássica	sim	NRASQ61G
37-1544-2	f	49	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	3.2	sim	não	não	não	tireoidite de Hashimoto	não	não
37-7758-8	f	41	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	1.2	sim	não	não	não	sem alterações	não estudado	não estudado

“continua”

Anexo B - Carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade: oxifilia, dados clínico-patológicos e alterações genéticas “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	DIÂMETRO (CM)	INVASÃO VASCULAR	INVASÃO CAPSULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	METÁSTASE	TIREÓIDE ADJACENTE	REARRANJO PAX8-PPAR γ	MUTAÇÃO RAS
38-9242-5	f	57	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo com necrose extensa	clássica	12	sim	não	não	não	sem alterações	não	não
39-1494-1	f	78	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	-	sim	não	não	não	tireoidite crônica linfocitária	não estudado	não
39-1767-3	f	32	Carcinoma folicular extensamente invasivo	ausente	9	sim	sim	não	não	bócio adenomatoso sem oxifilia	sim	HRASQ61R
39-4206-6	f	51	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	3.5	sim	não	não	não	sem alterações	não estudado	não estudado
39-5413-7	n	26	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	7	sim	sim	não	não	sem alterações	sim	não
40-2836-8	f	22	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	3	sim	não	não	não	sem alterações	não estudado	não
42-0251-1	f	57	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	5	sim	sim	não	não	bócio adenomatoso sem oxifilia + tireoidite crônica linfocitária	não	não
42-8340-6	f	43	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	1	não	não	não	não	tireoidite de Hashimoto	não	não
43-2740-3	f	41	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	1.5	não	não	não	não	sem alterações	não estudado	não

“continua”

Anexo B - Carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade: oxifilia, dados clínico-patológicos e alterações genéticas “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	DIÂMETRO (CM)	INVASÃO VASCULAR	INVASÃO CAPSULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	METÁSTASE	TIREÓIDE ADJACENTE	REARRANJO PAX8-PPAR γ	MUTAÇÃO RAS
44-3674-1	f	59	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	5.5	sim	não	não	não	bócio adenomatoso com oxifilia parcial	não	não
45-6879-6	f	52	Carcinoma folicular minimamente invasivo	parcial	5	sim	não	não	não	tireoidite crônica linfocitária	sim	não
45-9700-1	f	27	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	3.5	não	não	não	não	sem alterações	não estudado	não
46-7121-0	f	41	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	7	não	não	não	não	sem alterações	não	NRASQ61G
48-3772-0	f	51	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	5	não	não	não	não	bócio adenomatoso com e sem oxifilia	não estudado	NRASQ61G
49-3164-5	f	58	Carcinoma folicular extensamente invasivo	parcial	9	sim	sim	sim	sim	bócio adenomatoso com oxifilia parcial	não	NRASQ61G
49-5435-1	f	69	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	7.5	sim	sim	não	não	bócio adenomatoso com oxifilia clássica	não estudado	não estudado
49-6062-9	f	35	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	7	sim	não	não	não	sem alterações	não	não
49-6483-7	m	41	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	5	sim	não	não	não	sem alterações	não	não

“continua”

Anexo B - Carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade: oxifilia, dados clínico-patológicos e alterações genéticas “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	DIÂMETRO (CM)	INVASÃO VASCULAR	INVASÃO CAPSULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	METÁSTASE	TIREÓIDE ADJACENTE	REARRANJO PAX8-PPAR γ	MUTAÇÃO RAS
50-7374-0	f	41	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	1.5	sim	sim	não	não	bócio adenomatoso com oxifilia parcial	não estudado	não
50-8151-3	f	20	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	parcial	5	não	não	não	não	sem alterações	sim	não estudado
51-8240-9	f	25	Carcinoma folicular minimamente invasivo	parcial	1.5	sim	sim	não	não	sem alterações	sim	NRASQ61G
51-9702-3	f	45	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	2.5	não	não	não	não	sem alterações	não	não
52-2349-0	f	44	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	2	não	não	não	não	tireoidite crônica linfocitária	não	NRASQ61G
53-4715-7	f	50	Carcinoma folicular minimamente invasivo	ausente	2.7	sim	não	não	não	tireoidite Hashimoto + bócio adenomatoso sem oxifilia	sim	não
53-6661-5	f	69	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	5	sim	sim	não	não	bócio adenomatoso sem oxifilia	não	não
53-7255-0	f	38	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	4.5	sim	não	não	não	bócio adenomatoso com oxifilia	não	não
53-8301-5	f	77	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade variante oncocítica	clássica	6	não	não	não	não	sem alterações	não	não

“continua”

Anexo B - Carcinomas foliculares e tumores foliculares de potencial incerto de malignidade: oxifilia, dados clínico-patológicos e alterações genéticas “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	DIÂMETRO (CM)	INVASÃO VASCULAR	INVASÃO CAPSULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	METÁSTASE	TIREÓIDE ADJACENTE	REARRANJO PAX8-PPAR γ	MUTAÇÃO RAS
54-1481-4	m	34	Tumor folicular de potencial incerto de malignidade	ausente	4	não	não	não	não	sem alterações	sim	não
54-7614-3	f	76	Carcinoma folicular extensamente invasivo	parcial	9.5	sim	sim	não	sim	bócio adenomatoso com e sem oxifilia	não estudado	não estudado
55-3380-5	f	68	Carcinoma folicular variante oncocítica minimamente invasivo	clássica	3.2	não	sim	não	sim	bócio adenomatoso com oxifilia clássica	sim	não

“conclusão”

Anexo C - Carcinomas papilíferos: oxifilia, dados clínico-patológicos e mutações no gene BRAF

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	TAMANHO (CM)	MULTICENTRICIDADE	INVASÃO VASCULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	MUTAÇÃO BRAF	METÁSTASE GANGLIONAR	TIREÓIDE ADJACENTE
16-8968-1	m	23	variante folicular	clássica	9.5	não	sim	sim	ausente	não	sem alterações
17-6116-1	f	68	Warthin-like	clássica	2	não	não	sim	V600E	sim	bócio adenomatoso com oxifilia parcial e tireoidite crônica linfocitária
18-2862-	f	24	clássico	parcial	7	sim	sim	sim	ausente	sim	sem alterações
21-7613-0	f	45	variante folicular	parcial	4.2	sim	sim	sim	ausente	sim	bócio adenomatoso com oxifilia variável
23-0002-8	f	12	variante folicular	parcial	4	sim	sim	sim	ausente	sim	sem alterações
23-4968-0	m	55	clássico	parcial	4.3	sim	sim	sim	V600E	sim	bócio adenomatoso com oxifilia parcial
24-8781-0	f	60	clássico	parcial	2.2	sim	sim	sim	V600E	sim	bócio adenomatoso com oxifilia parcial
26-5917-9	f	54	clássico	ausente	3.8	não	sim	sim	V600E	sim	tireoidite de Hashimoto
28-1266-5	f	53	clássico	parcial	1.5	sim	sim	sim	ausente	não	tireoidite de Hashimoto bócio adenomatoso sem oxifilia
33-8114-5	m	46	microcarcinoma variante folicular	ausente	0.1	sim	não	não	não estudado	sim	sem alterações
37-3655-5	f	27	clássico	ausente	3.1	sim	sim	sim	ausente	sim	bócio colóide difuso sem oxifilia

“continua”

Anexo C - Carcinomas papilíferos: oxifilia, dados clínico-patológicos e mutações no gene BRAF “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	TAMANHO (CM)	MULTICENTRICIDADE	INVASÃO VASCULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	MUTAÇÃO BRAF	METÁSTASE GANGLIONAR	TIREÓIDE ADJACENTE
38-1798-5	f	54	microcarcinoma clássico	ausente	1	sim	não	não	ausente	não	tireoidite crônica linfocitária + bócio adenomatoso com oxifilia parcial
38-3527-8	f	51	variante folicular	clássica	4	não	sim	não	ausente	não	tireoidite crônica linfocitária
39-2928-0	f	57	variante folicular	parcial	10	sim	sim	sim	não estudado	sim	sem alterações
39-4746-7	f	39	clássico	parcial	1.1	sim	não	não	não estudado	não	sem alterações
39-6275-0	m	66	clássico	clássica	6	sim	sim	sim	V600E	sim	bócio adenomatoso sem oxifilia + tireoidite crônica linfocitária
39-7360-3	f	52	células claras	ausente	5	sim	sim	sim	ausente	sim	bócio adenomatoso sem oxifilia
40-1040-0	f	30	variante folicular	parcial	7.5	sim	sim	sim	não estudado	sim	sem alterações
40-6557-7	f	38	clássico + warthin-like	clássica	1.2	sim	não	não	ausente	não	bócio adenomatoso com oxifilia parcial
40-7017-8	m	28	clássico	parcial	3.5	sim	não	sim	ausente	sim	sem alterações
40-8066-1	f	63	clássico	parcial	2.3	não	não	sim	ausente	não	tireoidite crônica linfocitária
41-7697-9	f	33	microcarcinoma clássico	ausente	0.7	não	não	não	V600E	não	bócio adenomatoso sem oxifilia

“CONTINUA”

Anexo C - Carcinomas papilíferos: oxifilia, dados clínico-patológicos e mutações no gene BRAF “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	TAMANHO (CM)	MULTICENTRICIDADE	INVASÃO VASCULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREÓIDEA	MUTAÇÃO BRAF	METÁSTASE GANGLIONAR	TIREÓIDE ADJACENTE
41-9873-5	f	21	clássico	ausente	1.5	sim	sim	não	ausente	sim	sem alterações
42-0483-2	f	39	microcarcinoma clássico	parcial	0.4	sim	não	não	V600E	não	sem alterações
42-1286-0	f	33	clássico	parcial	1.5	sim	não	sim	V600E	não	sem alterações
42-7507-1	f	42	clássico	ausente	3.5	sim	sim	sim	V600E	sim	bócio adenomatoso com oxifilia parcial
43-1092-6	f	30	clássico	ausente	4.5	sim	sim	não	ausente	sim	bócio adenomatoso com e sem oxifilia
43-1798-0	f	38	clássico	parcial	5	não	não	não	não estudado	não	sem alterações
43-2052-2	f	47	clássico	parcial	1.2	não	não	não	ausente	não	bócio adenomatoso com oxifilia parcial + tireoidite crônica linfocitária
43-8467-9	f	33	clássico	parcial	2.5	sim	não	sim	não estudado	não	sem alterações
43-8675-2	f	41	variante folicular	clássica	1.5	sim	sim	não	não estudado	não	bócio adenomatoso sem oxifilia
43-9416-0	f	0	clássico	ausente	1.5	não	sim	não	não estudado	não	tireoidite crônica linfocitária
44-5689-0	m	67	clássico	ausente	2.5	sim	sim	sim	V600E	sim	bócio adenomatoso sem oxifilia

“CONTINUA”

Anexo C - Carcinomas papilíferos: oxifilia, dados clínico-patológicos e mutações no gene BRAF “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	TAMANHO (CM)	MULTICENTRICIDADE	INVASÃO VASCULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	MUTAÇÃO BRAF	METÁSTASE GANGLIONAR	TIREÓIDE ADJACENTE
45-7959-3	f	18	clássico	parcial	3.5	não	sim	não	não estudado	sim	sem alterações
45-8144-0	m	43	clássico com componente do tipo fasciíte nodular	parcial	2.5	sim	sim	sim	V600E	sim	sem alterações
45-8368-0	f	45	clássico	parcial	1.7	sim	não	não	V600E	não	bócio adenomatoso com e sem oxifilia
46-2017-8	f	41	clássico	parcial	2.6	não	não	não	V600E	não	bócio adenomatoso com oxifilia tireoidite crônica linfocitária
47-0537-8	f	54	clássico + variante folicular + warthin-like	clássica	1.5	sim	sim	sim	V600E	sim	tireoidite de hashimoto
47-4086-6	f	72	variante folicular	parcial	5.5	sim	sim	sim	ausente	sim	bócio adenomatoso sem oxifilia
47-5406-9	f	78	clássico	parcial	2.2	sim	não	sim	ausente	não	bócio adenomatoso sem oxifilia
47-5427-1	f	32	clássico	parcial	2	não	não	não	V600E	não	bócio colóide difuso
47-7483-3	f	37	clássico + variante folicular	parcial	0.8	sim	não	não	ausente	não	sem alterações
47-9747-7	f	72	microcarcinoma variante folicular	parcial	0.9	sim	não	sim	ausente	não	bócio adenomatoso sem oxifilia
48-5079-3	f	60	microcarcinoma warthin-like	clássica	0.9	não	não	não	ausente	não	tireoidite de hashimoto

“continua”

Anexo C - Carcinomas papilíferos: oxifilia, dados clínico-patológicos e mutações no gene BRAF “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	TAMANHO (CM)	MULTICENTRICIDADE	INVASÃO VASCULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	MUTAÇÃO BRAF	METÁSTASE GANGLIONAR	TIREÓIDE ADJACENTE
48-8303-9	f	35	clássico	ausente	3.5	sim	não	sim	V600E	sim	tireoidite crônica linfocitária
49-6588-4	f	41	warthin-like	parcial	1.5	sim	sim	sim	V600E	não	tireoidite de hashimoto
49-6823-9	f	44	variante folicular	ausente	4.5	sim	não	não	ausente	não	bócio adenomatoso com e sem oxifilia
49-8998-8	f	30	microcarcinoma clássico	ausente	0.7	sim	não	sim	V600E	sim	sem alterações
50-0307-5	f	64	microcarcinoma variante folicular	ausente	0.8	sim	não	não	V600E	não	sem alterações
50-2434-0	f	72	variante folicular	clássica	1.5	não	sim	não	não estudado	não	bócio adenomatoso com oxifilia parcial
50-3948-7	f	35	warthin-like	clássica	1.3	não	não	sim	ausente	não	tireoidite de hashimoto
50-4206-2	f	42	variante folicular	ausente	1.6	sim	sim	sim	ausente	sim	bócio adenomatoso sem oxifilia
50-7700-1	f	45	clássico	parcial	5.5	sim	sim	sim	V600E	sim	sem alterações
51-2601-0	f	55	warthin-like	parcial	3	sim	não	sim	V600E	não	tireoidite de hashimoto + bócio adenomatoso com oxifilia clássica
51-7788-0	f	39	clássico	ausente	1.7	não	não	não	V600E	não	tireoidite de hashimoto

“continua”

Anexo C - Carcinomas papilíferos: oxifilia, dados clínico-patológicos e mutações no gene BRAF “continuação”

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	TAMANHO (CM)	MULTICENTRICIDADE	INVASÃO VASCULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREOIDEA	MUTAÇÃO BRAF	METÁSTASE GANGLIONAR	TIREÓIDE ADJACENTE
51-9954-9	f	49	microcarcinoma clássico + variante folicular	ausente	0.7	sim	não	sim	não estudado	não	tireoidite crônica linfocitária
56-2607-2	m	76	variante folicular	clássica	2	não	não	não	não estudado	não	sem alterações

“conclusão”

Anexo D - Carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos: oxifilia, dados clínico-patológicos e mutações no gene BRAF

NÚMERO DO EXAME	SEXO	IDADE	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	INVASÃO VASCULAR	EXTENSÃO EXTRA-TIREÓIDEA	TAMANHO (CM)	MUTAÇÃO BRAF	TIREÓIDE ADJACENTE
30-6059-4	m	79	Carcinoma anaplásico fusocelular e de células gigantes associado a carcinoma papilífero variante folicular	parcial	sim	sim	11	ausente	bócio adenomatoso + tireoidite crônica linfocitária
397351-4	f	56	Carcinoma pouco diferenciado associado a carcinoma papilífero	ausente	sim	sim	8	ausente	sem alterações
43-8088-6	f	74	Carcinoma pouco diferenciado/anaplásico associado a carcinoma papilífero variante folicular	ausente	sim	sim	8	V600E (carcinoma pouco diferenciado)	bócio adenomatoso + tireoidite crônica linfocitária
44-2257-0	m	79	Carcinoma anaplásico fusocelular associado a carcinoma folicular variante oncocítica extensamente invasivo	ausente	sim	não	>10	não estudado	sem alterações
45-1310-0	m	64	Carcinoma pouco diferenciado variante oncocítica	clássica	sim	sim	7	ausente	bócio adenomatoso com oxifilia parcial
46-8043-0	m	60	Carcinoma pouco diferenciado	parcial	sim	sim	9	ausente	sem alterações
52-8242-0	f	52	Carcinoma pouco diferenciado variante oncocítica associado a carcinoma papilífero convencional	clássica	sim	sim	10	ausente	sem alterações

Anexo E - Adenoma folicular e bócio adenomatoso: oxifilia e dados histológicos

NÚMERO DO EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	OUTRAS ALTERAÇÕES NA TIREÓIDE ADJACENTE	CELULARIDADE
16-8354-3	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	tireoidite crônica linfocitária	+++
17-5051-8	adenoma folicular	ausente	não	+
17-5300-2	bócio adenomatoso	clássica	não	++
19-7378-9	bócio adenomatoso	parcial	tireoidite crônica linfocitária	+
21-1812-2	bócio adenomatoso	parcial	não	++
21-2057-7	bócio adenomatoso	parcial	não	++
22-0097-0	bócio adenomatoso	parcial	não	+++
24-1016-8	bócio adenomatoso	parcial	não	+++
24-2343-0	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+++
24-3178-5	adenoma folicular	ausente	não	++
24-6236-2	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+++
25-6056-9	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+++
25-8842-0	adenoma folicular	parcial	não	++
26-1998-2	bócio adenomatoso	clássica	tireoidite crônica linfocitária	++
28-0378-5	adenoma folicular	ausente	não	++
28-1976-7	bócio adenomatoso	variável	não	+++
28-2308-0	bócio adenomatoso	parcial	não	++
28-3850-8	adenoma folicular	parcial	não	+
28-7410-5	bócio adenomatoso	ausente	não	++
28-9232-4	bócio adenomatoso	parcial	não	+++
29-0495-0	adenoma folicular	ausente	não	++
29-0946-4	adenoma folicular	ausente	não	+++

“continua”

Anexo E - Adenoma folicular e bócio adenomatoso: oxifilia e dados histológicos “continuação”

NÚMERO DO EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	OUTRAS ALTERAÇÕES NA TIREÓIDE ADJACENTE	CELULARIDADE
29-7007-7	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+
30-7967-8	bócio adenomatoso	parcial.	não	++
31-0445-1	bócio adenomatoso	ausente	não	++
31-4892-0	bócio adenomatoso	clássica	tireoidite crônica linfocitária	+++
32-7613-3	bócio adenomatoso	clássica	não	++
33-0837-5	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+
33-1892-3	bócio adenomatoso	parcial	não	++
33-1893-1	adenoma folicular	parcial	não	+++
33-2667-5	adenoma folicular	ausente	não	++
33-8624-4	bócio adenomatoso	parcial	não	++
33-9478-6	bócio adenomatoso	parcial	não	++
34-0316-5	adenoma folicular	parcial	não	+
34-2263-1	bócio adenomatoso	clássica	não	+++
34-2332-8	bócio adenomatoso	clássica	não	+
34-2443-0	adenoma folicular	ausente	tireoidite crônica linfocitária	+
34-3295-5	bócio adenomatoso	parcial	não	+
34-6305-2	adenoma folicular	parcial	não	++
34-6530-6	adenoma folicular	ausente	não	+++
34-7552-2	adenoma folicular	ausente	não	+
35-2357-8	bócio adenomatoso	ausente	não	++
35-3600-9	bócio adenomatoso	parcial	não	+++
35-4830-9	bócio adenomatoso	clássica	não	+++

“continua”

Anexo E - Adenoma folicular e bócio adenomatoso: oxifilia e dados histológicos “continuação”

NÚMERO DO EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	OUTRAS ALTERAÇÕES NA TIREÓIDE ADJACENTE	CELULARIDADE
35-5516-0	adenoma folicular	parcial	não	+++
35-9991-4	bócio adenomatoso	clássica	não	+++
36-0353-9	adenoma folicular	ausente	não	++
36-0722-4	bócio adenomatoso	parcial	não	+
36-2000-0	bócio adenomatoso	parcial	não	++
36-5020-0	adenoma folicular	parcial	não	+++
36-6944-0	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	tireoidite crônica linfocitária	+++
36-8631-0	bócio adenomatoso	clássica	não	++
37-4170-2	bócio adenomatoso	ausente	não	++
37-8388-0	bócio adenomatoso	clássica	não	++
38-2258-3	bócio adenomatoso	parcial	não	++
38-3699-1	bócio adenomatoso	parcial	não	++
38-4092-1	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+
38-7550-4	adenoma folicular	parcial	não	+++
39-3144-7	adenoma folicular	ausente	não	++
40-2430-3	bócio adenomatoso	parcial	não	++
40-4383-9	bócio adenomatoso	clássica	não	++
40-5194-7	adenoma folicular	parcial	tireoidite de Hashimoto	+++
40-5603-5	adenoma folicular	ausente	não	+++
40-9086-1	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+++
40-9087-0	bócio adenomatoso	parcial	não	++
41-3800-7	bócio adenomatoso	clássica	não	+++

“continua”

Anexo E - Adenoma folicular e bócio adenomatoso: oxifilia e dados histológicos “continuação”

NÚMERO DO EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	OUTRAS ALTERAÇÕES NA TIREÓIDE ADJACENTE	CELULARIDADE
41-4623-9	adenoma folicular	ausente	tireoidite crônica linfocitária	++
41-5495-4	bócio adenomatoso	parcial	não	+++
42-0489-1	bócio adenomatoso	clássica	não	++
42-0738-6	bócio adenomatoso	clássica	tireoidite crônica linfocitária	+++
43-0004-1	bócio adenomatoso	clássica	tireoidite de Hashimoto	+++
43-3971-1	bócio adenomatoso	clássica	não	+++
43-5789-2	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+++
43-8761-9	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+++
44-2859-5	adenoma folicular variante oncocítica	clássica	não	+++
44-4064-1	adenoma folicular	parcial	Não	+++
44-8728-1	adenoma folicular	ausente	tireoidite crônica linfocitária	++
46-7611-4	adenoma folicular	parcial	não	+
47-0318-5	bócio adenomatoso	parcial	microcarcinoma papilífero com oxifilia parcial + tireoidite crônica linfocitária	++
47-8386-7	adenoma folicular	parcial	tireoidite crônica linfocitária	+++
47-8697-1	adenoma folicular	ausente	não	++
48-7441-2	bócio adenomatoso	clássica	não	+++
49-0144-4	adenoma folicular	parcial	microcarcinoma papilífero sem oxifilia	+++
49-9410-8	bócio adenomatoso	clássica	não	+
50-2853-1	adenoma folicular	parcial	não	+++
50-3922-3	bócio adenomatoso	parcial	não	+
50-3931-2	bócio adenomatoso	parcial	não	+

“continua”

Anexo E - Adenoma folicular e bócio adenomatoso: oxifilia e dados histológicos “continuação”

NÚMERO DO EXAME	DIAGNÓSTICO REVISÃO	OXIFILIA	OUTRAS ALTERAÇÕES NA TIREÓIDE ADJACENTE	CELULARIDADE
50-9684-7	bócio adenomatoso	clássica	microcarcinoma papilífero variante folicular com oxifilia parcial	+++
51-1373-3	bócio adenomatoso	parcial	não	+
51-2245-7	bócio adenomatoso	parcial	não	+++
51-3508-0	bócio adenomatoso	clássica	tireoidite crônica linfocitária	+++
51-4673-3	bócio adenomatoso	clássica	não	++
51-5799-4	adenoma folicular	ausente	tireoidite de Hashimoto	+++
51-6731-0	bócio adenomatoso	ausente	não	+
52-6141-4	bócio adenomatoso	clássica	microcarcinoma papilífero clássico com oxifilia parcial	++
53-7268-2	adenoma folicular	ausente	tireoidite crônica linfocitária	+++
54-5082-9	bócio adenomatoso	parcial	não	++
55-2779-1	bócio adenomatoso	ausente	não	+

“conclusão”

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yamazaki CA, Mamone MC, Ikejiri ES, Hidal JT, Matsumura LK, Hojaij FC, et al. [Incidence of malignant lesions in patients with clinically benign thyroid nodules: observational and prospective study in a cohort of 50 patients followed during two years]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48(2):282-93.
2. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. St. Louis: Elsevier; 2004.
3. Utiger RD. The multiplicity of thyroid nodules and carcinomas. *N Engl J Med* 2005;352(23):2376-8.
4. Graf H. [Thyroid nodular disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48(1):93-104.
5. Furlanetto TW, Peccin S, de OSMA, dos SZA, dos Reis PS, Genro SK, et al. [Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women]. *Rev Assoc Med Bras* 2000;46(4):331-4.
6. Bisi H, Ruggeri GB, Longatto Filho A, de Camargo RY, Fernandes VS, Abdo AH. Neoplastic and non-neoplastic thyroid lesions in autopsy material: historical review of six decades in Sao Paulo, Brazil. *Tumori* 1998;84(4):499-503.
7. Asa SL. My approach to oncocytic tumours of the thyroid. *J Clin Pathol* 2004;57(3):225-32.

8. Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am J Pathol* 2002;160(5):1857-65.
9. Sobrinho-Simoes M, Maximo V, Castro IV, Fonseca E, Soares P, Garcia-Rostan G, et al. Hurthle (oncocytic) cell tumors of thyroid: etiopathogenesis, diagnosis and clinical significance. *Int J Surg Pathol* 2005;13(1):29-35.
10. Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA 'common' deletion in Hurthle cell lesions of the thyroid. *J Pathol* 2000;192(4):561-2.
11. Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Hurthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch* 2000;437(2):107-15.
12. Nesland JM, Sobrinho-Simoes MA, Holm R, Sambade MC, Johannessen JV. Hurthle-cell lesions of the thyroid: a combined study using transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and immunocytochemistry. *Ultrastruct Pathol* 1985;8(4):269-90.
13. Maximo V, Botelho T, Capela J, Soares P, Lima J, Taveira A, et al. Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death, is linked to mitochondrion-rich (Hurthle cell) tumours of the thyroid. *Br J Cancer* 2005;92(10):1892-8.
14. Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, et al. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 2005;447(5):787-93.

15. Papotti M, Torchio B, Grassi L, Favero A, Bussolati G. Poorly differentiated oxyphilic (Hurthle cell) carcinomas of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 1996;20(6):686-94.
16. Berho M, Suster S. The oncocytic variant of papillary carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 15 cases. *Hum Pathol* 1997;28(1):47-53.
17. Thompson LD, Wieneke JA, Paal E, Frommelt RA, Adair CF, Heffess CS. A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature. *Cancer* 2001;91(3):505-24.
18. Sobrinho-Simoes MA, Nesland JM, Holm R, Johannessen JV. Transmission electron microscopy and immunocytochemistry in the diagnosis of thyroid tumors. *Ultrastruct Pathol* 1985;9(3-4):255-75.
19. Sobrinho-Simoes MA, Nesland JM, Holm R, Sambade MC, Johannessen JV. Hurthle cell and mitochondrion-rich papillary carcinomas of the thyroid gland: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Ultrastruct Pathol* 1985;8(2-3):131-42.
20. DeLellis RA, Lloyd, R.V., Heitz, P.U. and Eng, C. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2004.
21. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40(5):403-39.
22. Tallini G. Oncocytic tumours. *Virchows Arch* 1998;433(1):5-12.
23. Chu PG, Weiss LM. Cytokeratin 14 immunoreactivity distinguishes oncocytic tumour from its renal mimics: an immunohistochemical study of 63 cases. *Histopathology* 2001;39(5):455-62.

24. Allia E, Cassoni P, Marrocco T, Volante M, Bussolati B, Wong M, et al. Oxyphilic and non-oxyphilic thyroid carcinoma cell lines differ in expressing apoptosis-related genes. *J Endocrinol Invest* 2003;26(7):660-7.
25. Muller-Hocker J, Jacob U, Seibel P. Hashimoto thyroiditis is associated with defects of cytochrome-c oxidase in oxyphil Askanazy cells and with the common deletion (4,977) of mitochondrial DNA. *Ultrastruct Pathol* 1998;22(1):91-100.
26. Ebner D, Rodel G, Pavenstaedt I, Haferkamp O. Functional and molecular analysis of mitochondria in thyroid oncocyoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991;60(2):139-44.
27. Muller-Hocker J. Immunoreactivity of p53, Ki-67, and Bcl-2 in oncocytic adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Hum Pathol* 1999;30(8):926-33.
28. Jones JB, Song JJ, Hempen PM, Parmigiani G, Hruban RH, Kern SE. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a "mass"-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Res* 2001;61(4):1299-304.
29. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998;20(3):291-3.
30. Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, et al. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2001;61(16):5998-6001.

31. Yeh JJ, Lunetta KL, van Orsouw NJ, Moore FD, Jr., Mutter GL, Vijg J, et al. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene* 2000;19(16):2060-6.
32. Lewis PD, Baxter P, Paul Griffiths A, Parry JM, Skibinski DO. Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour. *J Pathol* 2000;191(3):274-81.
33. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer* 2003;3(3):193-202.
34. Burgart LJ, Zheng J, Shu Q, Strickler JG, Shibata D. Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol* 1995;147(4):1105-11.
35. Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Koh N, Takeda T, et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001;61(5):1843-5.
36. Maximo V, Sores P, Rocha AS, Sobrinho-Simoes M. The common deletion of mitochondrial DNA is found in goiters and thyroid tumors with and without oxyphil cell change. *Ultrastruct Pathol* 1998;22(3):271-3.
37. Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 2001;292(5517):624-6.
38. Katoh R, Harach HR, Williams ED. Solitary, multiple, and familial oxyphil tumours of the thyroid gland. *J Pathol* 1998;186(3):292-9.

39. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410(6828):549-54.
40. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002;1:9.
41. Volante M, Papotti M, Gugliotta P, Migheli A, Bussolati G. Extensive DNA fragmentation in oxyphilic cell lesions of the thyroid. *J Histochem Cytochem* 2001;49(8):1003-11.
42. Tischler AS, DeLellis RA. Tumors of thyroid follicular epithelium: where have we been and where are we going? *Endocr Pathol* 2002;13(4):267-9.
43. Santoro M, Thomas GA, Vecchio G, Williams GH, Fusco A, Chiappetta G, et al. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers. *Br J Cancer* 2000;82(2):315-22.
44. Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 2002;41(4):357-62.
45. Fusco A, Chiappetta G, Hui P, Garcia-Rostan G, Golden L, Kinder BK, et al. Assessment of RET/PTC oncogene activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma: a search for the early precursors of papillary cancer. *Am J Pathol* 2002;160(6):2157-67.
46. Fischer AH, Bond JA, Taysavang P, Battles OE, Wynford-Thomas D. Papillary thyroid carcinoma oncogene (RET/PTC) alters the nuclear envelope and chromatin structure. *Am J Pathol* 1998;153(5):1443-50.

47. Sheils OM, O'Leary JJ, Sweeney EC. Assessment of ret/PTC-1 rearrangements in neoplastic thyroid tissue using TaqMan RT-PCR. *J Pathol* 2000;192(1):32-6.
48. Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, et al. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res* 1998;4(2):287-94.
49. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simoes M. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 1998;185(1):71-8.
50. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1990;4(10):1474-9.
51. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2318-26.
52. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22(29):4578-80.
53. Scarpino S, Cancellario d'Alena F, Di Napoli A, Pasquini A, Marzullo A, Ruco LP. Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 2004;202(3):352-8.

54. Rocha AS, Soares P, Seruca R, Maximo V, Matias-Guiu X, Cameselle-Teijeiro J, et al. Abnormalities of the E-cadherin/catenin adhesion complex in classical papillary thyroid carcinoma and in its diffuse sclerosing variant. *J Pathol* 2001;194(3):358-66.
55. Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005;16(3):163-72.
56. Sobrinho-Simoes M. BRAF Mutations in Thyroid Carcinomas: Phenotype-Genotype Correlations. *Adv Anat Pathol* 2005;12(2):106-7.
57. Fagin JA. Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics--role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4264-6.
58. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5399-404.
59. 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;63(7):1454-7.
60. Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, et al. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4267-71.

61. Kumagai A, Namba H, Saenko VA, Ashizawa K, Ohtsuru A, Ito M, et al. Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4280-4.
62. Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch* 2005.
63. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004;202(2):247-51.
64. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijao T, Rebocho AP, Fonseca E, et al. BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Arch* 2004;444(6):572-6.
65. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(1):213-20.
66. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(9):4393-7.
67. Ciampi R, Zhu Z, Nikiforov YE. BRAF copy number gains in thyroid tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *Endocr Pathol* 2005;16(2):99-105.

68. Castro P, Eknaes M, Teixeira MR, Danielsen HE, Soares P, Lothe RA, et al. Adenomas and follicular carcinomas of the thyroid display two major patterns of chromosomal changes. *J Pathol* 2005.
69. Castro P, Sansonetty F, Soares P, Dias A, Sobrinho-Simoes M. Fetal adenomas and minimally invasive follicular carcinomas of the thyroid frequently display a triploid or near triploid DNA pattern. *Virchows Arch* 2001;438(4):336-42.
70. Fagin JA. Genetic basis of endocrine disease 3: Molecular defects in thyroid gland neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75(6):1398-400.
71. Scharck C, Fulton N, Jacoby RF, Westbrook CA, Straus FH, 2nd, Kaplan EL. N-ras 61 oncogene mutations in Hurthle cell tumors. *Surgery* 1990;108(6):994-9; discussion 999-1000.
72. Studer H, Gerber H, Zbaeren J, Peter HJ. Histomorphological and immunohistochemical evidence that human nodular goiters grow by episodic replication of multiple clusters of thyroid follicular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75(4):1151-8.
73. Kim DS, McCabe CJ, Buchanan MA, Watkinson JC. Oncogenes in thyroid cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003;28(5):386-95.
74. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol* 2004;15(4):319-27.
75. Fuhrer D. A nuclear receptor in thyroid malignancy: is PAX8/PPARgamma the Holy Grail of follicular thyroid cancer? *Eur J Endocrinol* 2001;144(5):453-6.

76. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000;289(5483):1357-60.
77. Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(9):4440-5.
78. Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, et al. Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):354-7.
79. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3947-52.
80. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002;26(8):1016-23.
81. French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin W, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 2003;162(4):1053-60.
82. Sahin M, Allard BL, Yates M, Powell JG, Wang XL, Hay ID, et al. PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation

-
- and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(1):463-8.
83. Carcangiu ML, Bianchi S, Savino D, Voynick IM, Rosai J. Follicular Hurthle cell tumors of the thyroid gland. *Cancer* 1991;68(9):1944-53.
 84. Apel RL, Asa SL, LiVolsi VA. Papillary Hurthle cell carcinoma with lymphocytic stroma. "Warthin-like tumor" of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 1995;19(7):810-4.
 85. D'Antonio A, De Chiara A, Santoro M, Chiappetta G, Losito NS. Warthin-like tumour of the thyroid gland: RET/PTC expression indicates it is a variant of papillary carcinoma. *Histopathology* 2000;36(6):493-8.
 86. Belchetz G, Cheung CC, Freeman J, Rosen IB, Witterick IJ, Asa SL. Hurthle cell tumors: using molecular techniques to define a novel classification system. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128(3):237-40.
 87. Cheung CC, Ezzat S, Ramyar L, Freeman JL, Asa SL. Molecular basis off hurthle cell papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(2):878-82.
 88. Chiappetta G, Toti P, Cetta F, Giuliano A, Pentimalli F, Amendola I, et al. The RET/PTC oncogene is frequently activated in oncocytic thyroid tumors (Hurthle cell adenomas and carcinomas), but not in oncocytic hyperplastic lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(1):364-9.
 89. Maxwell EL, Palme CE, Freeman J. Hurthle cell tumors: applying molecular markers to define a new management algorithm. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132(1):54-8.

90. Besic N, Hocevar M, Zgajnar J, Petric R, Pilko G. Aggressiveness of therapy and prognosis of patients with hurthle cell papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2006;16(1):67-72.
91. Haigh PI, Urbach DR. The treatment and prognosis of Hurthle cell follicular thyroid carcinoma compared with its non-Hurthle cell counterpart. *Surgery* 2005;138(6):1152-7; discussion 1157-8.
92. Besic N, Zgajnar J, Hocevar M, Frkovic-Grazio S. Is patient's age a prognostic factor for follicular thyroid carcinoma in the TNM classification system? *Thyroid* 2005;15(5):439-48.
93. Hanief MR, Igali L, Grama D. Hurthle cell carcinoma: diagnostic and therapeutic implications. *World J Surg Oncol* 2004;2(1):27.
94. Collini P, Sampietro G, Pilotti S. Extensive vascular invasion is a marker of risk of relapse in encapsulated non-Hurthle cell follicular carcinoma of the thyroid gland: a clinicopathological study of 18 consecutive cases from a single institution with a 11-year median follow-up. *Histopathology* 2004;44(1):35-9.
95. McDonald MP, Sanders LE, Silverman ML, Chan HS, Buyske J. Hurthle cell carcinoma of the thyroid gland: prognostic factors and results of surgical treatment. *Surgery* 1996;120(6):1000-4; discussion 1004-5.
96. Evans HL, Vassilopoulou-Sellin R. Follicular and Hurthle cell carcinomas of the thyroid: a comparative study. *Am J Surg Pathol* 1998;22(12):1512-20.
97. Alaedeen DI, Khiyami A, McHenry CR. Fine-needle aspiration biopsy specimen with a predominance of Hurthle cells: a dilemma in the

-
- management of nodular thyroid disease. *Surgery* 2005;138(4):650-6; discussion 656-7.
98. Giorgadze T, Rossi ED, Fadda G, Gupta PK, Livolsi VA, Baloch Z. Does the fine-needle aspiration diagnosis of "Hurthle-cell neoplasm/follicular neoplasm with oncocytic features" denote increased risk of malignancy? *Diagn Cytopathol* 2004;31(5):307-12.
 99. Pu RT, Yang J, Wasserman PG, Bhuiya T, Griffith KA, Michael CW. Does Hurthle cell lesion/neoplasm predict malignancy more than follicular lesion/neoplasm on thyroid fine-needle aspiration? *Diagn Cytopathol* 2006;34(5):330-334.
 100. Casey MB, Lohse CM, Lloyd RV. Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3, and HBME-1. *Endocr Pathol* 2003;14(1):55-60.
 101. Beesley MF, McLaren KM. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology* 2002;41(3):236-43.
 102. Nascimento MC, Bisi H, Alves VA, Longatto-Filho A, Kanamura CT, Medeiros-Neto G. Differential reactivity for galectin-3 in Hurthle cell adenomas and carcinomas. *Endocr Pathol* 2001;12(3):275-9.
 103. Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, Decaestecker C, Andre S, Kaltner H, et al. Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Mod Pathol* 2002;15(12):1294-301.

104. Williams ED. Guest Editorial: Two Proposals Regarding the Terminology of Thyroid Tumors. *Int J Surg Pathol* 2000;8(3):181-183.
105. Berean K, Suen K. Classification of thyroid tumors: is a change necessary? *Int J Surg Pathol* 2001;9(1):85-6.
106. Akslen LA, Myking AO. Differentiated thyroid carcinomas: the relevance of various pathological features for tumour classification and prediction of tumour progress. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421(1):17-23.
107. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14(4):338-42.
108. Sahoo S, Hoda SA, Rosai J, DeLellis RA. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution. *Am J Clin Pathol* 2001;116(5):696-702.
109. Raphael SJ. The meanings of markers: ancillary techniques in diagnosis of thyroid neoplasia. *Endocr Pathol* 2002;13(4):301-11.
110. Mai KT, Vaccani JP, Thomas J, Odell PF. Immunostaining for ret oncogene proteins in papillary thyroid carcinoma: a correlation of ret immunoreactivity and potential of lymph node metastasis. *Thyroid* 2001;11(9):859-63.
111. Fonseca E, Nesland JM, Hoie J, Sobrinho-Simoes M. Pattern of expression of intermediate cytokeratin filaments in the thyroid gland: an immunohistochemical study of simple and stratified epithelial-type cytokeratins. *Virchows Arch* 1997;430(3):239-45.
112. Rosai J. Immunohistochemical markers of thyroid tumors: significance and diagnostic applications. *Tumori* 2003;89(5):517-9.

113. Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL, et al. Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28(10):1336-40.
114. Erkilic S, Kocer NE. The role of cytokeratin 19 in the differential diagnosis of true papillary carcinoma of thyroid and papillary carcinoma-like changes in Graves' disease. *Endocr Pathol* 2005;16(1):63-6.
115. Erkilic S, Aydin A, Kocer NE. Diagnostic utility of cytokeratin 19 expression in multinodular goiter with papillary areas and papillary carcinoma of thyroid. *Endocr Pathol* 2002;13(3):207-11.
116. Cameron BR, Berean KW. Cytokeratin subtypes in thyroid tumours: immunohistochemical study with emphasis on the follicular variant of papillary carcinoma. *J Otolaryngol* 2003;32(5):319-22.
117. Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *Int J Surg Pathol* 2002;10(1):15-22.
118. Nishioka H, Ito H, Hirano A, Kato Y. Immunocytochemical demonstration of oncocytes in normal adenohypophysis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;97(1):40-4.
119. Shattuck TM, Westra WH, Ladenson PW, Arnold A. Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 2005;352(23):2406-12.
120. Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(11):4116-22.

121. Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1170-5.
122. Chen H, Nicol TL, Zeiger MA, Dooley WC, Ladenson PW, Cooper DS, et al. Hurthle cell neoplasms of the thyroid: are there factors predictive of malignancy? *Ann Surg* 1998;227(4):542-6.
123. Erickson LA, Jin L, Goellner JR, Lohse C, Pankratz VS, Zukerberg LR, et al. Pathologic features, proliferative activity, and cyclin D1 expression in Hurthle cell neoplasms of the thyroid. *Mod Pathol* 2000;13(2):186-92.
124. Tyler DS, Shaha AR, Udelsman RA, Sherman SI, Thompson NW, Moley JF, et al. Thyroid cancer: 1999 update. *Ann Surg Oncol* 2000;7(5):376-98.
125. Musholt PB, Imkamp F, von Wasielewski R, Schmid KW, Musholt TJ. RET rearrangements in archival oxyphilic thyroid tumors: new insights in tumorigenesis and classification of Hurthle cell carcinomas? *Surgery* 2003;134(6):881-9; discussion 889.
126. Tallini G. Molecular pathobiology of thyroid neoplasms. *Endocr Pathol* 2002;13(4):271-88.
127. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3226-35.
128. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(5):2414-20.

-
129. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 2004;23(44):7436-40.
 130. Parr RL, Dakubo GD, Thayer RE, McKenney K, Birch-Machin MA. Mitochondrial DNA as a potential tool for early cancer detection. *Hum Genomics* 2006;2(4):252-7.
 131. Tan DJ, Chang J, Liu LL, Bai RK, Wang YF, Yhe KT, et al. Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. *BMC Cancer* 2006;6(1):93.
 132. Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, et al. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004;90(12):2390-6.
 133. Perry ME, Dang CV, Hockenbery D, Moll U. Highlights of the National Cancer Institute Workshop on mitochondrial function and cancer. *Cancer Res* 2004;64(20):7640-4.
 134. Khafif A, Khafif RA, Attie JN. Hurthle cell carcinoma: A malignancy of low-grade potential. *Head Neck* 1999;21(6):506-11.
 135. Goldstein NS, Czako P, Neill JS. Metastatic minimally invasive (encapsulated) follicular and Hurthle cell thyroid carcinoma: a study of 34 patients. *Mod Pathol* 2000;13(2):123-30.

APÊNDICES

Artigos publicados, referentes à tese e citados no texto:

Apêndice A

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

Apêndice B

Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijao T, Rebocho AP, Fonseca E, Vieira de Castro I, Cameselle-Teijeiro J, Cardoso-Oliveira M, Sobrinho-Simões M . BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. Virchows Arch 2004;444(6):572-6.

Apêndice C

Sobrinho-Simoes M, Maximo V, Castro IV, Fonseca E, Soares P, Garcia-Rostan G, Cardoso de Oliveira M. Hurthle (oncocytic) cell tumors of thyroid: etiopathogenesis, diagnosis and clinical significance. Int J Surg Pathol 2005;13(1):29-35.

Apêndice D

Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Maximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhaes J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes 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.; 446: 589-595.

Apêndice E

Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes 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;91(1):213-20.

APÊNDICE A

Original Paper

BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma

Vítor Trovisco,^{1†} Inês Vieira de Castro,^{2†} Paula Soares,^{1,3} Valdemar Máximo,¹ Paula Silva,^{1,3} João Magalhães,^{1,4} Alexander Abrosimov,⁵ Xavier Matias Guiu⁶ and Manuel Sobrinho-Simões^{1,3,4*}

¹IPATIMUP (Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto), Porto, Portugal

²Department of Pathology, Medical Faculty, University of São Paulo, Brazil

³Department of Pathology, Medical Faculty, University of Porto, Porto, Portugal

⁴Department of Pathology, Hospital São João, Porto, Portugal

⁵Medical Radiology Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Obninsk, Russia

⁶Departments of Pathology, Hospital Sant Pau, Barcelona, and Hospital Clinic, Lerida, Spain

*Correspondence to:

Professor

Manuel Sobrinho-Simões,

IPATIMUP (Institute of Molecular Pathology and Immunology of the

University of Porto), R Roberto

Frias s/n, 4200 Porto, Portugal.

E-mail: ssimoes@ipatimup.pt

†These authors contributed equally to this work.

Abstract

Mutations in the *BRAF* gene have recently been detected in a wide range of neoplastic lesions with a particularly high prevalence in melanoma and papillary thyroid carcinoma (PTC). The hot-spot mutation *BRAF*^{V599E} is frequently detected in PTC (36–69%), in contrast to its absence in other benign or malignant thyroid lesions. In order to unravel whether there is any association between the occurrence of the *BRAF* mutation and the histological pattern of PTC, in this study a previous series of 50 PTCs was extended to 134 cases, including ten cases of PTC-related entities — hyalinizing trabecular tumour (HTT) and mucoepidermoid carcinoma (MEC). Using PCR/SSCP and sequencing, the *BRAF*^{V599E} mutation was detected in 45 of the 124 PTCs (36%). No mutations were detected in any case of HTT and MEC. *BRAF*^{V599E} was present in 75% of Warthin-like PTCs and 53% of conventional PTCs, whereas no *BRAF*^{V599E} mutations were detected in any of the 32 cases of the follicular variant of PTC. *BRAF*^{V599E} was also detected in 6 of 11 cases of the oncocytic variant of PTC that displayed a papillary or mixed follicular–papillary growth pattern and in none of the four oncocytic PTCs with a follicular growth pattern. A distinct mutation in *BRAF* (codon K600E) was detected in three cases of the follicular variant of PTC. This study has confirmed the high prevalence of *BRAF*^{V599E} in PTC and has shown that the mutation is almost exclusively seen in PTC with a papillary or mixed follicular–papillary growth pattern, regardless of the cytological features of the neoplastic cells. The results support the existence of an oncocytic variant of PTC that should be separated from the oncocytic variant of follicular carcinoma and suggest that the follicular variant of PTC may be genetically different from conventional PTC. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: papillary thyroid carcinoma; *BRAF*; oncogene; mutation; follicular variant; oncocytic cell variant

Received: 8 May 2003

Revised: 25 July 2003

Accepted: 27 October 2003

Introduction

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common malignant tumour of the thyroid. Until very recently, *RET/PTC* rearrangements were considered the genetic hallmark of PTC, despite their relatively low prevalence (5–30%) in PTCs of adult patients outside radiation settings [1–3].

The detection of a somatic mutation of *BRAF*, leading to the substitution of a valine for a glutamic acid (V599E), in a high percentage of PTCs (36–69%) [4–6] has provided new data on the aetiology and pathogenesis of PTC. The results on record show that after melanoma, in which the mutation is found in up to 70% of cases [7–9], PTC is the human cancer displaying the highest prevalence of *BRAF* mutation. The V599E mutation has also been detected in less than 15% of colon and ovarian carcinomas

[8,10,11], 5% of head and neck tumours, and 2% of lung carcinomas [5,7,12].

The 599 codon integrates a regulatory region — activation loop — and is placed between two regulatory residues (T598 and S601) whose phosphorylation is required for the full activity of *BRAF* [13]. Transfection with *BRAF*^{V599E} leads to a ten-fold increase in ERK activity and to a higher transforming capacity in COS and NIH3T3 cells, respectively [8]. It was thus proposed that the V599E substitution mimics the phosphorylation of the regulatory serines, leading to an elevated basal kinase activity of *BRAF* and activation of the MAPK pathway [8].

The three studies on *BRAF* mutations in PTC report the consistent finding of the same hot-spot in every positive case [4–6]. In our study, as well as in that of Kimura *et al* [4], such mutation was not found in any other type of benign or malignant thyroid tumour

and does not co-exist in any PTC with *RET/PTC* rearrangement or *RAS* mutation [4,6].

Taking into consideration the aforementioned consistency, it is tempting to propose that the different prevalences observed in the three series (36–69%) [4–6] may reflect their heterogeneity with regard to the histological types of PTC included.

In order to verify this hypothesis, we expanded our previous series of 50 cases of PTC to 134 cases, including a large number of cases of the follicular variant of PTC, several cases of the oncocytic variant of PTC and of Warthin-like PTC, as well as five cases of hyalinizing trabecular tumour (HTT) and five cases of mucoepidermoid carcinoma (MEC). We found *BRAF*^{V599E} in 45 of the 124 PTCs (36%). The mutation was particularly prevalent in Warthin-like PTC (75%) and conventional PTC (53%), in contrast to its absence in the follicular variant of PTC, HTT, and MEC. In three of the 32 cases of the follicular variant of PTC (9%), we detected a distinct mutation in *BRAF* (codon K600E); this mutation was not detected in any other histological type of PTC.

Materials and methods

The series was composed of 134 tumours from 125 patients (ten additional tumours were excluded for technical reasons). The material was retrieved from the files of Hospital de S João/Medical Faculty of Porto, Portugal; IPATIMUP, Porto, Portugal; Hospital de San Pau Y San Creu, Barcelona, Spain; and University Hospital of the State University of São Paulo, Brazil. Local ethical guidelines appropriate to each country were followed in this study. PTC cases and related tumours were classified according to the criteria advanced by Rosai *et al* [14] and LiVolsi [15] into the following histological types: conventional ($n = 53$), follicular variant ($n = 32$), oncocytic (Hürthle cell) variant ($n = 15$), Warthin-like variant ($n = 8$), tall cell variant ($n = 3$), diffuse sclerosing variant ($n = 2$), columnar cell variant ($n = 1$), microcarcinoma ($n = 10$), MEC ($n = 5$), and HTT ($n = 5$). A PTC was classified as a follicular variant of PTC whenever it was composed of small- to medium-sized, often elongated follicles with virtually no papillary structures and no psammoma bodies. All the tumours classified as follicular variant of PTC were bona fide cases, ie they had abundant nuclei displaying the typical nuclear features of PTC. The cases of the oncocytic variant of PTC were further sub-classified, according to their growth pattern, into conventional (papillary or mixed follicular/papillary) and follicular forms ($n = 11$ and 4, respectively). The histological evaluation was carried out independently by three experienced pathologists (IVC, AA, MSS) without information on the genetic data. Whenever there was a discrepancy, the cases were seen together under a multiple-head microscope and a consensus diagnosis was reached.

In 43 cases, representative samples of the tumours and adjacent 'normal' thyroid were obtained at the time of surgery, immediately collected, and frozen at -70°C . The material from the remaining 91 tumours was retrieved from paraffin blocks after careful microdissection performed by an experienced pathologist. Samples from 'normal', adjacent thyroid parenchyma were also analysed. Cases in which there was doubt about the quality of the DNA preservation were not included in the study.

Briefly, the two regions of *BRAF* where mutations were identified — G-rich loop/AKT binding sites and activation segment — encoded by exon 11 and exon 15, respectively, were analysed. Both exons were amplified by PCR using conditions described elsewhere [8]. The amplicons were then subjected to single stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis: electrophoresis of the denatured PCR products was carried out in non-denaturing $0.8\times$ mutation detection enhancement (MDE) gels (BMA, Rockland, ME, USA) at 180 V and 8°C for 15 h. PCR/SSCP products were visualized by standard DNA silver staining. Whenever a sample presented aberrant bands in the SSCP analysis, those bands were excised from the gel and re-amplified using the aforementioned PCR conditions. PCR products were subjected to a purifying treatment using exonuclease I (New England Biolabs, Inc) and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and subjected to automatic sequencing, using an ABI Prism dGTP BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) and an ABI prism 3100 Genetic Analyser (Perkin-Elmer). Sequencing was performed on both strands.

Results are expressed as a percentage. The chi-square test with Yates' correction was used in the statistical analysis of the results. Two values were considered significantly different when $p < 0.05$.

Results

We detected the *BRAF*^{V599E} mutation in 45 of the 124 PTCs (36%). No mutations were detected in any case of HTT or MEC, or in the thyroid parenchyma adjacent to the tumours, regardless of the presence in some cases of nodular goitre and lymphocytic thyroiditis. In Table 1, we have summarized the prevalence of the *BRAF*^{V599E} mutation in the different histological types of tumour.

The *BRAF*^{V599E} mutation was present in 75% of the cases of Warthin-like PTC (6/8) and in 53% of the cases of conventional PTC (28/53). These figures contrast with the absence of the mutation in the 32 cases of the follicular variant of PTC (0%) ($p < 0.0001$).

The mutation was detected in 6 of 15 cases of the oncocytic variant of PTC (40%). The six mutations were observed in the 11 cases of the oncocytic variant of PTC with a conventional (papillary or mixed

Table 1. Prevalence of the BRAF^{V599E} mutation according to the tumour histotype in 124 papillary thyroid carcinomas, five hyalinizing trabecular tumours (HTTs), and five mucoepidermoid carcinomas (MECs)

Histotype	BRAF ^{V599E}
Conventional PTC (n = 53)	28 (53%)
Follicular variant of PTC (n = 32)	0 (0%)*
Oncocytic variant of PTC (n = 15)	6 (40%)
Conventional (n = 11)	6 (55%)
Follicular pattern (n = 4)	0 (0%)
Warthin-like PTC (n = 8)	6 (75%)
Microcarcinoma (n = 10)	4 (40%)
Tall cell variant of PTC (n = 3)	1 (33%)
Diffuse sclerosing variant of PTC (n = 2)	0 (0%)
Columnar cell variant of PTC (n = 1)	0 (0%)
HTT (n = 5)	0 (0%)
MEC (n = 5)	0 (0%)

* The BRAF^{K600E} mutation was detected in three cases of the follicular variant of PTC (9%).

follicular/papillary) pattern of growth (55%), whereas none of the four cases displaying a follicular growth pattern had the mutation (0%) (Table 1).

We also detected the *BRAF* mutation in a tall cell variant of PTC (1/3) and in four out of ten papillary microcarcinomas (Table 1).

Two or three independent tumours were studied in eight cases. In four of these cases, tumours with the BRAF^{V599E} mutation co-existed with tumours without the mutation (Table 2 and Figure 1).

A mutation in exon 15 of *BRAF* but in a different codon (nucleotide 1798 A-G changing a lysine for a glutamic acid in codon 600 — BRAF^{K600E}) was detected in three of the 32 cases of the follicular variant of PTC (9%).

No alterations were found in exon 11 of *BRAF* in any case.

Table 2. BRAF^{V599E} mutations and histological types in eight cases presenting two or three carcinomas*

Case No	Carcinoma	BRAF
1	Papillary microcarcinoma	V599E
	Oncocytic variant of PTC	Wild type
2	Papillary microcarcinoma	Wild type
	Conventional PTC	Wild type
3	Papillary microcarcinoma (Figure 1A)	Wild type
	Tall cell variant of PTC (Figure 1B)	V599E
4	Follicular variant of PTC	Wild type
	Oncocytic variant of (follicular variant of) PTC	Wild type
5	Oncocytic variant of PTC	Wild type
	Follicular variant of PTC	Wild type
6	Follicular variant of PTC	Wild type
	Conventional PTC	Wild type
7	Papillary microcarcinoma	Wild type
	Conventional PTC	V599E
8	Papillary microcarcinoma	V599E
	Follicular variant of PTC (Figure 1C)	Wild type
	Warthin-like PTC (Figure 1D)	V599E

* In all the cases, no *BRAF* mutations were detected in any sample of 'normal' adjacent thyroid tissue.

Discussion

We detected the BRAF^{V599E} mutation in 36% of bona fide PTCs. This percentage lies at the lower end of the spectrum of previous reports for PTC (36–69%) [4–6] but has a limited value *per se*, since we have also demonstrated that the prevalence of the mutation varies substantially from one histological type to another.

Our results show that the BRAF^{V599E} mutation is almost exclusively seen in PTC with a conventional (papillary or mixed follicular–papillary) pattern of growth and is particularly prevalent in those with a predominantly papillary structure, as is the case for Warthin-like PTC.

The BRAF^{V599E} mutation was not detected in any case of the follicular variant of PTC. In three cases of this variant, a distinct *BRAF* mutation (codon K600E) was detected. The BRAF^{K600E} mutation has already been described in a follicular adenoma of the thyroid [6] and in colorectal carcinoma and melanoma [7,11]. These data support the assumption that the follicular variant of PTC shows genetic differences from conventional PTC.

The BRAF^{V599E} mutation was also not detected in HTT and MEC, two types of tumour that some authors consider to be related to PTC and are characterized by a predominantly trabecular or solid pattern of growth [14,15]. With regard to the comparison between PTC and HTT, our data on *BRAF* mutation differ from those on *RET/PTC* rearrangements, which have been detected in a similar proportion of cases of conventional PTC and HTT [16,17].

At variance with their presence in 40% of cases of the oncocytic variant of PTC, *BRAF* mutations were not detected in any oncocytic variant of follicular adenoma or in any oncocytic follicular carcinoma (Trovisco *et al*, unpublished observations). All the BRAF^{V599E} mutations detected in oncocytic PTCs were found in tumours displaying a papillary or a mixed growth pattern (and not in those with a follicular pattern), thus reinforcing the association between the presence of the mutation and the papillary phenotype.

The results that we obtained in the group of oncocytic PTCs support the assumption that the so-called oncocytic carcinomas should be divided into papillary and follicular carcinomas according to their nuclear characteristics, rather than being put together in a single category. A similar conclusion had been drawn by Cheung *et al* [18] and Belchetz *et al* [19], who showed that *RET/PTC* rearrangements were detected in a number of cases of the oncocytic variant of PTC, but not in the oncocytic variant of follicular carcinoma.

The functional significance of BRAF^{V599E} and BRAF^{K600E} mutations in thyroid oncogenic transformation is still unknown, despite being usually ascribed the role of activation of the MAPK signalling pathway, which may lead to proliferation and/or survival stimuli [20]. The low proliferation and the low apoptotic rate of PTC [21], together with the

Figure 1. (A, B) Case 3. (A) Papillary microcarcinoma, encapsulated, with follicular architecture, no *BRAF* mutation (H&E; $\times 100$). (B) Tall cell variant of PTC with *BRAF* mutation (H&E; $\times 100$). (C, D) Case 8. (C) Follicular variant of PTC, no *BRAF* mutation (H&E; $\times 400$). (D) Warthin-like PTC with *BRAF* mutation (H&E; $\times 200$)

anti-apoptotic role of *BRAF* revealed by knock-out mice [22], favour the importance of a survival stimulus induced by *BRAF* mutations. It has been demonstrated that MEN2-activated RET can signal through NF- κ B, leading to activation of survival signals in the TT-1 medullary carcinoma cell line. This pathway requires active Ras and Raf-1, but does not follow the classic MAPK signalling cascade, suggesting an alternative pathway involving the membrane shuttle kinase MEKK1 [23,24]. We do not know if this survival pathway is also activated by *BRAF* mutations.

BRAF^{V599E} mutation and *RET/PTC* rearrangements appear closely linked to the conventional histological type of PTC. In previous studies [4,6], it was verified that *BRAF* mutations do not co-exist with *RET/PTC* rearrangements, or with *Ras* mutations, leading to the suggestion of the alternative activation of a single signalling pathway in PTC: *RET/PTC*–*Ras*–*BRAF*.

A close association between genetic alteration and phenotype had already become apparent when it was found that PTCs with *RET/PTC1* rearrangement tended to be of the conventional type and to display a predominantly papillary growth pattern [3], whereas *RET/PTC3* was most often found in the solid and

tall cell variant of PTC [25,26]. The aforementioned findings, together with the clinical aggressiveness associated with some cases of the solid and tall cell variant of PTC, led to the suggestion that genetic alteration could play a role in the clinical course of PTC [25,26]. We do not know if this may also be true for *BRAF* mutations that have been detected both in microcarcinomas and in the tall cell variant of PTC. We have also detected the mutation in PTCs that have extended beyond the thyroid capsule and/or given rise to lymph node metastases (Trovisco *et al*, unpublished observations), but our series is too small and too limited from a clinical standpoint to allow any definite conclusions on this issue.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia POCTI/FEDER (POCTI/ESP/43631/99). We are also grateful to FCT for grant support to Vítor Trovisco.

References

1. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, *et al*. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1517–1522.

2. Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 223–228.
3. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simões M. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 1998; **185**: 71–78.
4. 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; **63**: 1454–1457.
5. Cohen Y, Xing M, Mambo E, *et al.* BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**: 625–627.
6. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, *et al.* BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003; **22**: 4578–4580.
7. Brose MS, Volpe P, Feldman M, *et al.* BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002; **62**: 6997–7000.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**: 949–954.
9. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genet* 2003; **33**: 19–20.
10. Singer G, Oldt R III, Cohen Y, *et al.* Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**: 484–486.
11. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; **418**: 934.
12. Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002; **62**: 7001–7003.
13. Chong H, Lee J, Guan KL. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J* 2001; **20**: 3716–3727.
14. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. *Tumors of the Thyroid Gland*, 3rd Series. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC, 1992.
15. LiVolsi V. *Surgical Pathology of the Thyroid*. WB Saunders: Philadelphia, 1990.
16. Papotti M, Volante M, Giuliano A, *et al.* RET/PTC activation in hyalinizing trabecular tumors of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 2000; **24**: 1615–1621.
17. Cheung CC, Boerner SL, MacMillan CM, Ramyar L, Asa SL. Hyalinizing trabecular tumor of the thyroid: a variant of papillary carcinoma proved by molecular genetics. *Am J Surg Pathol* 2000; **24**: 1622–1626.
18. Cheung CC, Ezzat S, Ramyar L, Freeman JL, Asa SL. Molecular basis of Hürthle cell papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 878–882.
19. Belchetz G, Cheung CC, Freeman J, Rosen IB, Witterick IJ, Asa SL. Hürthle cell tumors: using molecular techniques to define a novel classification system. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; **128**: 237–240.
20. Sears RC, Nevins JR. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* 2002; **277**: 11 617–11 620.
21. Soares P, Sobrinho-Simões M. Recent advances in cytometry, cytogenetics and molecular genetics of thyroid tumours and tumour-like lesions. *Pathol Res Pract* 1995; **191**: 304–317.
22. Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, *et al.* Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature Genet* 1997; **16**: 293–297.
23. Ludwig L, Kessler H, Wagner M, *et al.* Nuclear factor-kappaB is constitutively active in C-cell carcinoma and required for RET-induced transformation. *Cancer Res* 2001; **61**: 4526–4535.
24. Baumann B, Weber CK, Troppmair J, *et al.* Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 4615–4620.
25. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2002; **13**: 3–16.
26. Basolo F, Giannini R, Monaco C, *et al.* Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002; **160**: 247–254.

APÊNDICE B

Paula Soares · Vítor Trovisco · Ana Sofia Rocha ·
Tália Feijão · Ana Paula Rebocho · Elsa Fonseca ·
Inês Vieira de Castro · José Cameselle-Teijeiro ·
Manuel Cardoso-Oliveira · Manuel Sobrinho-Simões

***BRAF* mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas**

Received: 4 February 2004 / Accepted: 19 March 2004 / Published online: 17 April 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Somatic mutations of the *BRAF* gene (*BRAF*^{V599E} and *BRAF*^{K600E}) were found to be closely associated with different histotypes of papillary thyroid carcinoma (PTC). The V599E mutation is highly prevalent in PTC with a papillary or mixed papillary follicular growth pattern, and the K600E mutation is apparently restricted to the follicular variant of PTC. It is usually

accepted that thyroid malignancies may follow a progression path from well-differentiated to poorly differentiated (PDC) and undifferentiated (UC) carcinomas. One would expect that at least some of the less differentiated carcinomas would harbour the genetic alterations of pre-existing well-differentiated tumours. In order to find the prevalence of *BRAF* mutations in PDC and UC, we screened a series of 19 PDCs and 17 UCs, as well as 3 UC-derived cell lines, for both mutation types. The group of PDCs was restricted to the so-called insular and insular-like PDCs, thus excluding PTCs with solid, insular or trabecular foci of growth and PDCs displaying typical PTC nuclei. No *BRAF* mutations were detected in any of the 19 cases of PDC, whereas 6 of the UCs (35%) and one UC-derived cell line presented the *BRAF*^{V599E} mutation. The *BRAF*^{K600E} mutation was not detected in any case. We conclude that UC may progress from *BRAF*^{V599E}-mutated PTC. The absence of *BRAF* mutations in our series of PDC supports the assumption that pure insular and insular-like PDCs are more closely related to follicular carcinoma than to PTC.

Keywords *BRAF* · Oncogene · Mutation · Papillary thyroid carcinoma · Undifferentiated thyroid carcinoma · Poorly differentiated thyroid carcinoma

Paula Soares and Vítor Trovisco contributed equally to this work.

P. Soares · V. Trovisco · A. S. Rocha · T. Feijão · A. P. Rebocho ·
M. Sobrinho-Simões (✉)
IPATIMUP (Institute of Molecular Pathology and Immunology
of the University of Porto),
R. Roberto Frias s/n,
4200 Porto, Portugal
e-mail: ssimoes@ipatimup.pt
Tel.: +351-22-5570799
Fax: +351-22-5570700

P. Soares · M. Sobrinho-Simões
Department of Pathology,
Medical Faculty, University of Porto,
Porto, Portugal

E. Fonseca · M. Sobrinho-Simões
Department of Pathology,
Hospital São João,
Porto, Portugal

I. Vieira de Castro
Department of Pathology,
Medical Faculty, University of São Paulo,
Brazil

J. Cameselle-Teijeiro
Department of Pathology,
Hospital Clínico Universitario,
University of Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela, Spain

M. Cardoso-Oliveira
Department of Surgery B,
Hospital São João,
Porto, Portugal

Introduction

The thyroid gland presents a wide spectrum of tumours derived from follicular cells that range from well-differentiated papillary and follicular carcinomas (PTC and FTC, respectively), usually carrying a good prognosis, to the clinically aggressive, poorly differentiated (PDC) and undifferentiated (UC) carcinomas [17].

It is usually accepted that PDC and UC occur either de novo or progress from pre-existing well-differentiated carcinomas through a multi-step process of mutations and clonal expansion [17, 23, 26].

Recently, our group and others reported a very high prevalence of a particular missense mutation in the *BRAF* gene (*BRAF*^{V599E}) in PTC—46%—as well as in PTC-derived cell lines [4, 8, 22]. We have also shown that such a mutation occurs in a high proportion of PTCs with a papillary or mixed papillary follicular pattern of growth (53%) in contrast with its absence in the follicular variant of PTC [25]; in the latter, we detected another missense *BRAF* mutation (*BRAF*^{K600E}) in about 9% of the cases [25]. This genetic alteration, like the V599E, corresponds with the activation segment of the *BRAF* gene (exon 15); it had been previously detected in a few cases of melanoma and colorectal carcinoma [2, 15] and, by our group, in a follicular adenoma of the thyroid [22].

Genetic alterations in PDC and UC are far from being totally clarified. Assuming that PDC and UC may derive from well-differentiated thyroid carcinomas, it is expected that some PDCs and UCs would harbour genetic alterations that are typical of PTC (*RET/PTC* rearrangements and *BRAF* mutations) and FTC (*Ras* mutations and *PAX8-PPAR* gamma rearrangements) [9, 12].

Regarding the prevalence of *BRAF* mutations in PDC and UC, there is very little (and contradictory) evidence on record. The *BRAF*^{V599E} mutation has been screened in PDC by Nikiforova and colleagues [13], who found the mutation in 2 of 16 cases (13%); the two positive cases had a PTC component in which the *BRAF*^{V599E} was also detected. In UC, the results are contradictory: Namba and colleagues [11] detected *BRAF*^{V599E} in 2 of 6 cases (33%) and Nikiforova and colleagues [13] found *BRAF*^{V599E} in 3 of 29 UC cases (10%), while Fukushima and colleagues [5] did not detect any *BRAF*^{V599E} mutations in 7 UC cases.

Since part of the aforementioned controversy may be due to the small size of the samples, we decided to search for *BRAF* mutations in a series of 19 PDCs and 17 UCs, as well as in 3 UC-derived cell lines. Taking into consideration our finding of different *BRAF* mutations in conventional PTCs and follicular variants of PTC (*BRAF*^{V599E} and *BRAF*^{K600E}, respectively) [25], we have specifically looked for both types of *BRAF* mutations in our series of PDC and UC in an attempt to find out whether any of them may be associated with the neoplastic progression of PTC.

Materials and methods

Materials

Material from 36 patients with thyroid tumours was collected from four institutions in three countries: Hospital de S. João/Medical Faculty of Porto, Portugal; IPATIMUP, Porto, Portugal; University Hospital of the State University of São Paulo, Brasil; Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, Spain. This study was approved by the ethics committees of the four institutions, and informed consent was obtained from all patients. We also studied three UC-derived cell lines, kindly provided by Prof. J.E. Dumont and Prof. Marc Mareel: 8505c; Hth74; c643.

The tumours were classified according to the criteria of Heider and colleagues [7], LiVolsi [10] and Rosai and colleagues

[17]. The cases were screened for thyroglobulin, calcitonin, carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratins. All the carcinomas displaying extensive immunoreactivity for calcitonin and/or CEA (medullary carcinoma) were not included in the series. From the group of PDCs, we also did not include PTCs with foci of a solid growth pattern [18], PTCs with an insular component [1] and trabecular and/or solid thyroid carcinomas with nuclei with the typical features of PTC nuclei [7, 10, 17]. Whenever there was disagreement in the diagnosis, the sections were reviewed by the authors in an attempt to reach a consensus. The few cases in which such consensus was not achieved were also not included in the series.

The material was retrieved from paraffin blocks after careful microdissection performed by an experienced pathologist. DNA extraction was performed using the Puregene DNA Isolation Kit (GENTRA Systems, Minneapolis, USA) following the manufacturers instructions. Cases in which there were doubts on the quality of the DNA preservation have not been included in the study.

BRAF mutation analysis

To screen for *BRAF* mutations, we analysed DNA from tumour tissue. We studied the regions (activation segment—exon 15) of the *BRAF* gene where mutations had been previously identified in PTC. The PCR conditions were described elsewhere [22]. The amplicons were then subjected to single-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis: PCR reaction products of *BRAF* exon 15 were diluted 1:1 with loading buffer (95% formamide, 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol), denatured at 96°C for 10 min and cooled on ice for 5 min; electrophoresis of the denatured PCR products was carried out in non-denaturing 0.8× mutation detection enhancement (MDE) gels (BMA, Rockland, ME USA) at 180 V and 8°C for 15 h; PCR/SSCP products were visualised by standard DNA silver staining of the gels.

BRAF sequencing analysis

Whenever a case presented aberrant bands in the SSCP analysis the remaining PCR sample was subjected to a purifying treatment using Exonuclease I (New England Biolabs, Inc., Beverly, USA) and Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and subjected to automatic sequencing, using ABI Prism dGTP BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster City, California) and an ABI prism 3100 Genetic Analyser (Perkin-Elmer). Sequencing was performed on both strands using the aforementioned primers.

Results

We did not detect *BRAF* mutations (V599E or K600E) in any of the 19 PDCs (Fig. 1) despite the existence in several cases of nuclei that superficially resembled those of papillary carcinoma (Fig. 1D).

The *BRAF*^{V599E} mutation was detected in 6 of the 17 UCs (35%) (Fig. 2). The 6 *BRAF*-positive UCs were predominantly composed of spindle cells ($n=3$), epithelioid cells ($n=2$) and giant cells ($n=1$). The histotype distribution of *BRAF*-positive cases is not significantly different from that of UC without *BRAF* mutation. No *BRAF*^{K600E} mutations were detected in any UC.

One of the three cell lines (8505c) displayed only the *BRAF*^{V599E} allele (Fig. 3). No *BRAF*^{K600E} mutations were detected in any of the cell lines.

Fig. 1 **A** Poorly differentiated carcinoma (PDC) of the insular-type with wild-type *BRAF* (4×). **B** Higher magnification of the insular-type PDC depicted in **A** (10×). **C** Higher magnification of the case depicted in **A** and **B** (40×). **D** High magnification of a PDC of the insular-type displaying nuclei superficially resembling those of papillary thyroid carcinoma, with wild-type *BRAF* (40×)

Fig. 2 Undifferentiated carcinoma (UC) with and without *BRAF*^{V599E} mutation with similar histotypes. **A** UC predominantly composed of spindle cells harbouring the *BRAF*^{V599E} mutation (10×). **B** UC predominantly composed of spindle cells with the wild-type *BRAF* (10×). **C** UC predominantly composed of polygonal cells harbouring the *BRAF*^{V599E} mutation (20×). **D** UC predominantly composed of polygonal cells with wild-type *BRAF* (20×)

Fig. 3 Single-stranded conformation polymorphism analysis for the *BRAF* exon 15 in the undifferentiated carcinoma cell lines. Arrow indicates the shifted band that corresponds to the sequence. There is a total nucleotide substitution at the 1796 position (V599E) identified by the arrowhead

Discussion

Genetic alterations in PDC and UC are still poorly known. It is usually accepted that less-differentiated thyroid carcinomas may progress from well-differentiated carcinomas. Since PTC is far more frequent than FTC, one would expect that at least some PDCs and UCs would harbour typical genetic alterations of PTC, namely RET/PTC rearrangements and/or *BRAF* mutations.

We have detected the *BRAF*^{V599E} mutation in about 35% of the cases of UC and in one of the three UC-derived cell lines. Our result fits with the finding of Namba and colleagues (2 of 6 cases—33%—displayed the V599E mutation) [11] and contrasts with the absence of *BRAF* mutations reported by Fukushima and colleagues in his small series of 7 UC cases [5] and the low prevalence reported by Nikiforova and colleagues (10% of the UC had the mutation) [13].

The frequency of *BRAF*^{V599E} mutation in PTC varies from 29% to 69% in different series [4, 8, 22, 27], depending mainly on the prevalence of PTC histotypes which are known to be more associated with *BRAF*^{V599E} (namely papillary and mixed follicular/papillary forms of PTC) [25].

The detection of the *BRAF*^{V599E} mutation in about one-third of UC of our series supports the assumption that PTCs harbouring such a mutation may progress to UC. So far, we have detected the presence of the *BRAF*^{V599E} mutation in both components of an UC displaying an independent focus of PTC (data not shown). The search for *BRAF*^{V599E} mutations in both components of cases of mixed PTC/UC and the analysis of the outcome of patients with *BRAF*-positive PTCs followed-up for long periods will hopefully clarify whether or not *BRAF* mutations are associated with a more frequent progression of PTC towards UC.

We did not detect the *BRAF*^{K600E} mutation in any UCs; but, given the small prevalence of the mutation in the follicular variant of PTC, it is difficult to evaluate the

meaning of this negative result (i.e. we cannot conclude that PTCs harbouring this mutation do not progress towards undifferentiated tumours). At variance with UC, we did not detect *BRAF* mutations (V599E or K600E) in any of the 19 PDCs.

The method we used for the selection of the cases that constitute our series of PDC—namely the exclusion of PTC with foci of solid growth pattern [18], PTC with an insular component [1], and trabecular and/or solid carcinomas with nuclei of the PTC type [7, 10, 17]—contributed to reducing the heterogeneity of tumours classified as PDC [23] and may explain the absence of *BRAF* mutations in any of the 19 cases. This possibility is indirectly confirmed by the results of Nikiforova and colleagues [13], who have only detected the *BRAF*^{V599E} mutation in the two PDCs displaying foci of typical PTC in which the mutation was also detected.

The quite different percentages of RET/PTC rearrangement and *β-catenin* mutations reported in different series of PDC [6, 16, 19, 20, 21, 24] probably reflect also the heterogeneity of tumours that are often included under the umbrella category of PDC [23]. In contrast to the aforementioned heterogeneity, our series is only constituted by cases that fit the original description of insular carcinoma [3], and by insular-like carcinomas (solid and trabecular carcinomas without PTC nuclei) [14].

The absence of *BRAF* mutations in our series of 19 PDCs supports the assumption that the PDCs we analysed are more closely related to FTC than to PTC. Our findings thus confirm the data previously obtained by electron microscopy, morphometry and lectin histochemistry in a group of PDCs selected according to the same criteria used in the present study [23].

We did not study PTC with morphological signs of poor differentiation (solid, insular and trabecular foci) and therefore we ignore the prevalence of the two types of *BRAF* mutations in such PTC-derived poorly differentiated tumours. Additional studies including these and other morphological subtypes of PDC will help to clarify the role played by *BRAF* mutations in the progression towards different histotypes of less-differentiated thyroid carcinomas.

Acknowledgements This study was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia POCTI/FEDER (POCTI/NSE/48171/2002). We are grateful to FCT for grant support to Vítor Trovisco (FSRH/BD/13055/2003) and Ana Sofia Rocha (FSRH/BD/21775/99). We would also like to thank Prof. J.E. Dumont and Prof. Marc Mareel for providing the cell lines included in this study.

References

1. Ashfaq R, Vuitch F, Delgado R, Albores-Saavedra J (1994) Papillary and follicular thyroid carcinomas with an insular component. *Cancer* 73:416–423
2. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL (2002) *BRAF* and *RAS*

- mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62:6997–7000
3. Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J (1984) Poorly differentiated (“insular”) thyroid carcinoma. A reinterpretation of Langhans’ “wuchernde Struma”. *Am J Surg Pathol* 8:655–668
 4. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D (2003) BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95:625–627
 5. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, Sekikawa K, Hagiwara K, Takenoshita S (2003) BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 22:6455–6457
 6. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G (2001) Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumour phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 158:987–996
 7. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH (1988) World Health Organization international histological classification of tumours. Springer, Berlin Heidelberg New York
 8. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signalling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454–1457
 9. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA (2000) PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 289:1357–1360
 10. LiVolsi V (1990) Surgical pathology of the thyroid. WB Saunders, Philadelphia
 11. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S (2003) Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4393–4397
 12. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE (2003) RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumours: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318–2326
 13. 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 (2003) BRAF mutations in thyroid tumours are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5399–5404
 14. Papotti M, Botto Micca F, Favero A, Palestini N, Bussolati G (1993) Poorly differentiated thyroid carcinomas with primordial cell component. A group of aggressive lesions sharing insular, trabecular, and solid patterns. *Am J Surg Pathol* 17:291–301
 15. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002) RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934
 16. Rocha AS, Soares P, Fonseca E, Cameselle-Teijeiro J, Oliveira MC, Sobrinho-Simoes M (2003) E-cadherin loss rather than beta-catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas. *Histopathology* 42:580–587
 17. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA (1992) Tumours of the thyroid gland. Armed Force Institute of Pathology, Washington, DC
 18. Sakamoto A, Kasai N, Sugano H (1983) Poorly differentiated carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic entity for a high-risk group of papillary and follicular carcinomas. *Cancer* 52:1849–1855
 19. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, Pierotti MA, Bongarzone I, Della Porta G, Berger N et al (1992) Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 89:1517–1522
 20. Santoro M, Papotti M, Chiappetta G, Garcia-Rostan G, Volante M, Johnson C, Camp RL, Pentimalli F, Monaco C, Herrero A, Carcangiu ML, Fusco A, Tallini G (2002) RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 87:370–379
 21. Shiels OM, O’Leary JJ, Sweeney EC (2000) Assessment of ret/PTC-1 rearrangements in neoplastic thyroid tissue using Taq-Man RT-PCR. *J Pathol* 192:32–36
 22. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M (2003) BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578–4580
 23. Sobrinho-Simões M, Sambade C, Fonseca E, Soares P (2002) Poorly-differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Int J Surg Pathol* 10:123–131
 24. Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, Carcangiu ML, Fusco A (1998) RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res* 4:287–294
 25. Trovisco V, Castro IV, Soares P, Máximo V, Silva P, Magalhães J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simões M (2004) BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 202:247–251
 26. Wynford-Thomas D (1997) Origin and progression of thyroid epithelial tumours: cellular and molecular mechanisms. *Hormone Res* 47:145–157
 27. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA (2003) High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 63:4561–4567

APÊNDICE C

Hürthle (oncocytic) cell tumours of thyroid: Etiopathogenesis, diagnosis and clinical significance

Manuel Sobrinho-Simões,MD,PhD^{1,2}, Valdemar Máximo,BSc,PhD², Inês Vieira de Castro,MD³, Elsa Fonseca,MD, PhD^{1,2}, Paula Soares BSc, PhD^{1,2}, Ginesa Garcia-Rostan, MD, PhD², Manuel Cardoso de Oliveira, MD, PhD^{2,4}

¹Department of Pathology, Medical Faculty of the University of Porto, Portugal

²Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Portugal

³Department of Pathology, Medical Faculty of the University of São Paulo, Brasil

⁴Department of Surgery, Medical Faculty of the University of Porto, Portugal

Illustrations: Seven figures, three of which with a) and b)

Address for correspondence: Dr. Manuel Sobrinho Simões

IPATIMUP, Rua Dr. Roberto Frias s/n; 4200-465 Porto, Portugal; FAX: 351-225570799; e-mail: ssimoes@ipatimup.pt

Hürthle (oncocytic) cell tumours of thyroid: Etiopathogenesis, diagnosis and clinical significance

It is difficult to find a subject in thyroid oncology that has been more mistreated than that of Hürthle (oncocytic) cell tumours. The problems started a couple of decades ago when it was said (and widely accepted) that all oncocytic tumours of the thyroid were malignant. This claim was disproved by several groups in the seventies/eighties but the confusion persisted with regard to the clinico-pathologic singularity of the carcinomas with oncocytic features, which were thought to represent a group of thyroid neoplasms that should be placed into a category independent from those of papillary and follicular carcinoma (For a review see refs 1-3).

We know now that the oncocytic lesions of the thyroid (and of other organs...) may be non-neoplastic or neoplastic and, within the latter, benign or malignant. We also know that these lesions are composed by cells stuffed with mitochondria with morphological, functional and genetic abnormalities. It is estimated that a full blown oncocytic cell has 4000 to 5000 mitochondria whereas an eosinophil or a sperm cell has about 30 mitochondria; the human cell with more abundant mitochondria is the oocyte which has about 1500 mitochondria (For a review see refs 3-5).

Etiopathogenesis

The accumulation of mitochondria in the cytoplasm of the oncocytic cells may be due to a primary alteration of the mitochondrial DNA (mtDNA) that encode mitochondrial enzymes(6). Regardless of the mechanism involved in the process, any deficient mitochondrial function leads to an increased number of mitochondria through the stimulation of mitochondrial proliferation (via transcription factor(s) encoded by the nucleus) (3,6). It is not known yet whether a decreased turn-over of the mitochondria may also contribute to their accumulation in oncocytic cells.

The most typical mtDNA alteration in oncocytic cells is the presence of a large deletion (about 5kb that corresponds to one third of the total DNA in each mitochondrial chromosome) (7). This large deletion is usually designated by "common deletion" and has been detected in oncocytic cells of Hashimoto's thyroiditis and all sorts of oncocytic tumours of the thyroid, as well as in Warthin's tumour of the salivary glands(7,9). Point mutations in the mitochondrial genes encoding for enzymes of the complexes I, III, IV and V of the mitochondrial respiratory chain (MRC) have also been reported in oncocytic tumours of the thyroid (6).

The mitochondria containing deleted and/or mutated mtDNA proliferate more than "normal" mitochondria, thus leading to a progressive increase in the percentage of abnormal mitochondria in the cells' cytoplasm (3).

Mutations in the nuclear genes encoding for enzymes of the MRC or the Krebs cycle may also lead to an increased number of mitochondria provided the deficient mitochondrial function triggers a compensatory proliferation of the organelles (3).

The main difference between the mtDNA and the nDNA pathway concerns the hereditary aspects. If one is dealing with nDNA germline mutations the condition is inherited as a mendelian trait whereas the same does not hold true when mtDNA is involved (The mtDNA dependent disorders are maternally inherited and do not follow the mendelian rules) (10).

The pathogenic mechanism leading to a progressive accumulation of mitochondria provides a basis to support the claim that the oncocyctic transformation is not a black and white phenomenon – the mitochondria accumulate for years in the cytoplasm of cells that are not dividing or are slowly dividing. The process starts by cells with a normal number of mitochondria, progresses towards cells with slightly increased mitochondria (oncocytoid cells – Fig.1) until reaching a full-blown status of oncocyctic cells. The time lapse needed to allow the accumulation of mitochondria may be relatively long and explains why oncocyctic cells are only prominent in old or relatively old patients with Hashimoto's thyroiditis (Patients with Hashimoto's thyroiditis younger than 20 rarely present oncocyctic cells) (3).

This pathogenic mechanism also explains the existence of oncocyctic (oxyphilic, eosinophilic) cells in tumours of parenchymatous organs (thyroid, parathyroids, kidneys, salivary glands, adrenals) and/or in endocrine/neuroendocrine tumours, regardless of the organ of origin, whereas they are extremely rare in carcinomas of GI tract, respiratory tract, skin, and so on and so forth. The mitochondria can only accumulate in cells of tumours that are not actively dividing, i.e., relatively slow growing neoplasms; in rapidly growing neoplasms the division of the cytoplasm of the neoplastic cells prevents the accumulation of the mitochondria. Following this line of reasoning it makes sense that most oncocyctic tumours are benign or low malignant neoplasms (example: renal oncocytomas). The only exception appears to be some oncocyctic carcinomas of the thyroid (see below).

It is not yet well understood the mechanism of tumour formation under these circumstances. Several possibilities have been advanced: a) The mitochondrial abnormalities block (in a way or another...) the apoptotic process increasing the survival of the cells (11); b) The deficient mitochondrial function is sensed as a hypoxic stimulus leading to increased levels of the inducible form of the Hypoxic Inducible Factor (HIF-1) which triggers some pro-angiogenesis pathways (and also proliferation?) (For a review on these two possibilities see ref. 10).

In Fig.2 we have summarized the most important steps of oncocyctic (Hürthle) cell tumourigenesis.

The study of sporadic and familial forms of PTC with oncocytic features has shown that it is likely that the occurrence of such tumours depends both on the mitochondrial alterations – which would lead to hyperplastic lesions and/or benign tumours – and one or several oncogenic steps (In the case of PTC these steps may be rearrangements of RET/PTC or TRK , or a BRAF mutation). It is this concept that is represented in Fig. 3.

The timing of the occurrence of the oncogenic step(s) leads to two different situations: the so-called primary and secondary oxyphilia, in which either all the tumour cells, or only a part of them, present oncocytic features, respectively (Figs. 4 and 5).

Diagnosis

It is now almost unanimously accepted that the oncocytic appearance of thyroid follicular cells is a phenotypic trait that may occur in all sorts of benign and malignant lesions: Hashimoto's thyroiditis, nodular goiters, adenomas and carcinomas. The same holds true for thyroid c-cells and cells of other organs and/or tumours (medullary carcinoma of the thyroid, parathyroids of old individuals, several types of endocrine and neuroendocrine tumours).

In the group of thyroid carcinomas there is enough clinico-pathologic evidence to support the concept that every type of carcinoma has its oncocytic counterpart. This concept has been incorporated in the forthcoming edition of the WHO Classification in which the “old” Hürthle (oncocytic) carcinoma is substituted by oncocytic variants of papillary carcinoma, follicular carcinoma and poorly differentiated carcinoma (12). It is extremely rare to see oncocytic features in an undifferentiated carcinoma probably because the neoplastic cells of this type of tumour divide too rapidly to allow the accumulation of mitochondria.

Despite acknowledging the existence of some controversies most authors claim that the typical molecular features of conventional papillary and follicular carcinomas are also present in their oncocytic counterparts (12,13). This has been recently shown by us with regard to the BRAF V600E. This mutation is detected in about 50% of conventional PTC as well as in about 50% of cases of the oncocytic variant of PTC (14,15). It is also very prevalent in Warthin-like PTC which is characteristically composed by oncocytic cells (15). Curiously, the V600E BRAF mutation is not detected in the follicular variant of FVPTC, nor in cases of the oncocytic variant of PTC displaying a follicular growth pattern (15), thus supporting the concept that the oncocytic features do not interfere with the carcinogenic pathway.

The criteria used in the diagnosis of the oncocytic variants of PTC and follicular carcinoma are those used in the diagnosis of conventional tumours: Mainly the nuclear characteristics in PTC (Fig.6) and the signs

of capsular and/or vascular invasion in follicular carcinoma. The same holds true regarding the diagnosis of variants of PTC such as the papillary microcarcinoma (16), as well as the diagnosis of the recently described “well differentiated tumour of uncertain malignant potential” and “well differentiated carcinoma, not otherwise specified” (12,17). In every setting the presence of oncocytic cells should not interfere with the diagnostic criteria.

Clinical significance

The prognosis of patients with oncocytic variant of PTC is similar to that of patients with conventional PTC (and the same holds true regarding follicular carcinomas) provided the age of the patients and the staging of the tumours are comparable (12,18). The only negative aspect of oncocytic carcinomas of the thyroid is their less ability to trap iodine thus turning them less responsive to radioactive iodine (3).

Three last clinico-pathologic points on these tumours: a) Although it is now widely accepted that many oncocytic tumours are benign (oncocytic adenomas) one still keeps the concept that the percentage of oncocytic tumours displaying signs of invasiveness is higher than in their conventional counterparts (Take home lesson: one should go on searching actively for capsular and vascular invasion, and for PTC nuclei, in oncocytic tumours that look benign at a first glance) (1,2,12).

b) Benign and malignant oncocytic tumours tend to suffer ischemic necrosis, mainly after fine needle aspiration (Fig.7). The reasons behind this finding, which may be linked to the apoptosis blockage exhibited by oncocytic tumour cells, are discussed by Máximo and Sobrinho-Simões, 2000. (3).

c) There are well documented familial thyroid tumours exhibiting prominent oncocytic features. These tumours may be benign (usually multiple adenomas) or malignant (PTC or follicular carcinoma, occasionally arising in pre-existing benign, oncocytic lesions). Several nuclear genes encoding for enzymes of MRC or Krebs cycle are apparently involved in these familial cases (10,19).

References

1. LiVolsi V. Surgical Pathology of the Thyroid. W.B. Saunders: Philadelphia, 1990.
2. Rosai J. Tumors of the thyroid Gland. 3rd Series. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1993
3. Máximo V, Sobrinho-Simões M. Hürthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. Virchows Arch 437:107-115, 2000.
4. Nesland JM, Sobrinho-Simões MA, Holm R, Sambade MC, Johannessen JV. Hurthle cell lesions of the thyroid: a combined study using transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and immunocytochemistry. Ultrastruct Pathol 8:269-290, 1985.
5. Sobrinho-Simões MA, Nesland JM, Holm R, Sambade C, Johannessen JV. Hurthle cell-and mitochondrion-rich papillary carcinomas of the thyroid gland. An ultrastructural and immunocytochemical study. Ultrastruct Pathol 8:131-142, 1985.

6. Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology. A study with emphasis on Hürthle cell tumors. *Am J Pathol* 160:1857-1865, 2002
7. Muller-Hocker J, Jacob U, Seibel P. Hashimoto thyroiditis is associated with defects of cytochrome-c oxidase in oxyphil Askanazy cells and with the common deletion (4,977) of mitochondrial DNA. *Ultrastruct Pathol* 22:91-100, 1998
8. Máximo V, Sobrinho-Simões M. Mitochondrial DNA 'common' deletion in Hürthle cell lesions of the thyroid. (Letter to the editor) *J Pathol* 192:561-562, 2000.
9. Lewis PD, Baxter P, Griffiths AP, Parry JM, Skibinski DOF. Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthins tumour. *J. Pathol* 191:274–281, 2000.
10. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer*. 3:193-202, 2003
11. Allia E, Cassoni P, Marrocco T, Volante M, Bussolati B, Wong M, Clark OH, Papotti M. Oxyphilic and non-oxyphilic thyroid carcinoma cell lines differ in expressing apoptosis-related genes *J Endocrinol Invest* 26:660-667, 2003
12. DeLellis R. Tumours of the thyroid and parathyroid. In: *Tumours of Endocrine Organs*. Lyon. World Health Organization Classification of Tumours, 2004; (in press).
13. Cheung CC, Ezzat S, Ramyar L, Freeman JL, Asa SL. Molecular basis of Hurthle cell papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 85:878-882, 2000.
14. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578-4580, 2003.
15. Trovisco V, Vieira- Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simoes M. BRAF mutations are associated with some histiotypes of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 202:2147-251, 2004.
16. Rosai J, LiVolsi VA, Sobrinho-Simoes M, Williams ED. Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: The Porto proposal. *Int J Surg Pathol* 11:249-251, 2003
17. Williams ED. Two proposals regarding the terminology of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 8:181-183, 2000.
18. Evans HL, Vassilopoulou-Sellin R. Follicular and Hürthle cell carcinomas of the thyroid: a comparative study. *Am J Surg Pathol* 22:151-152, 1998
19. Máximo V, Botelho T, Capela J, Soares P, Lima J, Taveira A, Amaro T, Barbosa AP, Preto A, Harach HR, Williams D, Sobrinho-Simoes M. Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death is linked to mitochondrion-rich (Hürthle cell) tumours of the thyroid, 2004 (submitted)

Fig.1

Fig. 2

Alterations of nuclear genes that encode
mitochondrial enzymes
Ex. SDHx, FH and GRIM-19

Alterations of Mt genes
(Complex I, III, IV, V)

Hürthle cell features

Mitochondrial proliferation

Defective mitochondria

Blockage of apoptosis and stimulation
Of angiogenesis (and proliferation?) via
activation of HIF-1 and other factors

Tumourigenesis

Fig. 3

MtDNA alterations

nDNA → mt alterations

**Cell growth
(benign tumour)**

**+ "Oncogenic
Step(s)"**

CANCER

Fig.4a

Fig. 4b

Fig.5a

Fig.5b

Fig.6

Fig. 7a

Fig.7b

Figures Legends

Fig. 1 – Thyroid adenoma composed of cells with a relatively large and granular cytoplasm – oncocytoïd cells.

Fig. 2 – Schematic representation of the most important steps in oncocytoïc (Hürthle cell) tumourigenesis

Fig. 3 – Schematic representation of oncocytoïc (Hürthle cell) carcinogenesis

Fig. 4a) – All the neoplastic cells in this follicular variant of PTC display oncocytoïc features; b) Schematic representative of the histogenesis of so-called primary oxyphilia

Fig. 5a) – Only part of the neoplastic cells in this conventional PTC display oncocytoïc features; b) Schematic representation of the histogenesis of so-called secondary oxyphilia

Fig. 6 – Oncocytoïc variant of PTC – Notice the oncocytoïc features and the PTC-like nuclei

Fig. 7. Oncocytoïc variant of follicular carcinoma. Macroscopic (a) and low power histologic appearance (b) showing foci of haemorrhagic necrosis.

APÊNDICE D

Vítor Trovisco · Paula Soares · Ana Preto · Inês Vieira de Castro · Jorge Lima ·
Patrícia Castro · Valdemar Máximo · Tiago Botelho · Severina Moreira ·
Ana Margarida Meireles · João Magalhães · Alexander Abrosimov ·
José Cameselle-Teijeiro · Manuel Sobrinho-Simões

Type and prevalence of *BRAF* mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness

Received: 13 January 2005 / Accepted: 17 February 2005 / Published online: 19 May 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract A high prevalence of the *BRAF*^{V600E} somatic mutation was recently reported in several series of papillary thyroid carcinomas (PTC). This mutation appears to be particularly prevalent in PTC with a predominantly papillary architecture. Another *BRAF* mutation (K601E) was

detected in a follicular adenoma and in some cases of the follicular variant of PTC. The few studies on record provided controversial data on the relationship between the occurrence of *BRAF* mutations and clinicopathologic parameters such as gender, age and tumour staging. In an attempt to clarify such controversies we decided to enlarge our previous series to 315 tumours or tumour-like lesions diagnosed in 280 patients, including a thorough analysis of several clinicopathologic features. The *BRAF*^{V600E} mutation was exclusively detected in PTC with a papillary or mixed follicular/papillary architecture both of the conventional type (46%) and of other histotypes, such as microcarcinoma (43%), Warthin-like PTC (75%) and oncocytic variant of PTC (55%). The *BRAF*^{K601E} mutation was detected in four of the 54 cases of the follicular variant of PTC (7%). The mean age of patients with conventional PTC harbouring *BRAF*^{V600E} (46.7 years) was significantly higher ($P<0.0001$) than that of patients with conventional PTC without *BRAF*^{V600E} (29.5 years). The *BRAF* (*BRAF*^{V600E}) mutated PTC did not exhibit signs of higher aggressiveness (size, vascular invasion, extra-thyroid extension and nodal metastasis) and were in fact less often multicentric than PTC without the mutation.

V. Trovisco and P. Soares contributed equally to this work

Fundação para a Ciência e Tecnologia POCTI/FEDER (POCTI/NSE/48171/2002)

V. Trovisco · P. Soares · A. Preto · J. Lima · P. Castro · V. Máximo ·
T. Botelho · S. Moreira · A. M. Meireles · M. Sobrinho-Simões (✉)
IPATIMUP (Institute of Molecular Pathology and
Immunology of the University of Porto),
R. Roberto Frias s/n,
4200 Porto, Portugal
e-mail: ssimoes@ipatimup.pt
Tel.: +351-22-5570700
Fax: +351-22-5570799

P. Soares · M. Sobrinho-Simões
Department of Pathology,
Medical Faculty of the University of Porto,
Porto, Portugal

I. V. de Castro
Department of Pathology,
Medical Faculty of the University of São Paulo,
São Paulo, Brazil

J. Magalhães · M. Sobrinho-Simões
Department of Pathology, Hospital São João,
Porto, Portugal

A. Abrosimov
Pathology Department,
Medical Radiology Research Centre,
Russian Academy of Medical Sciences,
Obninsk, Russia

J. Cameselle-Teijeiro
Department of Pathology,
Hospital Clínico Universitario,
University of Santiago de Compostela,
Santiago de Compostela, Spain

Keywords Thyroid · Papillary carcinoma · Follicular variant of PTC · Oncocytic variant · *BRAF* · Oncogene

Introduction

Raf proteins are serine/threonine kinases that play an initial role in the enzymatic cascade of the MAPK signalling pathway Raf-MEK-ERK [16]. Mutations from valine to glutamic acid at the residue 600 (formerly referred as residue 599 [10]) of the *BRAF* gene, first described with a high frequency in melanoma [3, 7], were found to be highly prevalent in PTC in several series [6, 9, 13, 22, 26].

We have recently shown that the large variation of the mutation prevalence in different studies (29–69% of PTC) [6, 9, 13, 22, 26] probably reflects the different histotype

composition of the reported series. The mutation is almost exclusively detected in PTC with a papillary or mixed follicular/papillary architecture (conventional PTC; Warthin-like PTC; oncocytic variant of PTC with a predominantly papillary growth pattern), being extremely rare in other variants of PTC [24].

The follicular variant of PTC was characterized by the presence of another *BRAF* mutation (K601E) in three out of 32 cases (9%) [24]. This genetic alteration corresponds, like the V600E, to the activation segment of the *BRAF* gene (exon 15). It had been previously detected in rare cases of melanoma and colorectal carcinoma [3, 18] and, by our group, in two follicular adenomas of the thyroid [11, 22].

Xu and colleagues [26] reported that the *BRAF*^{V600E} mutation was significantly more prevalent in PTC of males than those occurring in females and more prevalent, although without reaching statistical significance, in PTC of older individuals. Nikiforova and colleagues [15] found that the *BRAF*^{V600E} mutation is significantly associated with older age of the patients but not with their gender. Finally, Namba and colleagues [13], Puxeddu and colleagues [17] and Kim and colleagues [8] did not find any significant association between the presence of the *BRAF*^{V600E} mutation and the gender and age of patients.

Namba and colleagues [13] and Nikiforova and colleagues [15] reported that the *BRAF*^{V600E} mutation was associated with tumour stages III and IV, and Xu and colleagues [26], Namba and colleagues [13] and Kim and colleagues [8] reported an association between *BRAF*^{V600E} and metastatic tumours. In contrast to this, Puxeddu and colleagues [17] did not find any association between the presence of *BRAF*^{V600E} in PTC and tumour staging, local invasiveness or lymph node metastasis.

In an attempt to clarify the aforementioned discrepancies and to reinforce (or refute) our previous data on the association between the occurrence of *BRAF* mutations and some PTC histotypes, we decided to enlarge our series of differentiated tumours of the thyroid and tumour-like lesions. We have specifically studied additional cases of conventional PTC and some PTC variants (follicular variant, oncocytic variant and microcarcinoma), as well as cases with more than one type of tumour. We also tried to elucidate any possible relationship between the occurrence of *BRAF* mutations and some clinicopathologic features (multicentricity, vascular invasion, extra-thyroid extension and lymph node metastasis).

Materials and methods

Materials Material from 280 patients with 315 tumours and tumour-like lesions of the thyroid was collected from seven institutions in four countries: Hospital de S. João/Medical Faculty of Porto, Porto, Portugal; IPATIMUP, Porto, Portugal; IPO, Lisboa, Portugal; Hospital de San Pau Y San Creu, Barcelona, Spain; Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, Spain; Hospital das Clínicas, Medical Faculty of the University of São Paulo, Brasil; Medical Radiological Research Centre of Russian

Academy of Medical Sciences, Russian Federation. Two or three independent lesions (including six cases in which there were foci of nodular lymphocytic thyroiditis adjacent to PTC) were studied in 30 patients.

The histological classification was made according to the criteria of LiVolsi [12] and Rosai and colleagues [19] by three pathologists (I.V.C., A.A., M.S.S.) without information on *BRAF* data. Whenever there was a discrepancy, the case was discussed together under a multiple head microscope and a consensus diagnosis was reached.

Data on gender and age were available in 278 patients. The size of the tumours diagnosed as follicular adenoma, follicular carcinoma or PTC was available in 197 cases. In Table 1 we have summarized the histological classification of the lesions, the age and gender of patients and the size of the tumours.

Data on multicentricity, vascular invasion, extra-thyroid extension and lymph node metastasis were available in 93 of the 156 clinically evident PTC (all but 20 microcarcinomas).

One hundred lesions were added to the 215 tumours and tumour-like lesions that had been previously assessed for *BRAF* mutations in two previous studies [22, 24]. In 20 lesions, two ($n=18$) or three ($n=2$) different samples were screened for *BRAF* mutations. The DNA material was retrieved from paraffin blocks after careful microdissection performed by an experienced pathologist. DNA extraction was performed using the Puregene DNA Isolation Kit (GENTRA Systems, Minneapolis, Minn., USA) following the manufacturer's instructions. Cases in which there were doubts on the quality of the DNA preservation have not been included in the study.

***BRAF* mutation analysis** To screen for *BRAF* mutations, we analysed DNA from tumour tissue. We studied the regions of *BRAF* where mutations were previously identified—AKT binding sites/G-rich loop region and activation segment—which are encoded by exon 11 and 15, respectively. Both exons were amplified by PCR using conditions described elsewhere [22]. The amplicons were then subjected to single stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis: PCR reaction products of *BRAF* exons 11 and 15 were diluted 1:1 with loading buffer (95% formamide, 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol), denatured at 96°C for 10 min and cooled on ice for 5 min; electrophoresis of the denatured PCR products was carried out in non-denaturing 0.8X mutation detection enhancement (MDE) gels (BMA, Rockland, Maine, USA) at 180 V and 8°C for 15 h; PCR/SSCP products were visualized by standard DNA silver staining of the gels.

***BRAF* sequencing analysis** Whenever a case presented aberrant bands in the SSCP analysis, the remaining PCR sample was subjected to a purifying treatment using Exonuclease I (New England Biolabs Inc., Beverly, USA) and shrimp alkaline phosphatase (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., USA) and subjected to automatic sequencing, using ABI Prism dGTP BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster City, California)

Table 1 Gender ratio and mean age of the 280 patients with 315 thyroid tumours and tumour-like lesions according to the histological classification, as well as the size of the tumours, and the prevalence of BRAF^{V600E} mutation^a

Histotypes	No. of cases	Gender ratio (♀:♂)	Mean age (years±SE)	Tumour size (cm±SE) ^b	BRAF ^{V600E} mutation
Nodular lymphocytic thyroiditis	6	6:0	48.7±4.8	NA ^c	0/6 (0%)
Nodular goiter	39	6.8:1	49.4±2.3	NA ^c	0/39 (0%)
Follicular thyroid adenoma	58	4.8:1	44.1±2.1	3.6±0.3 (47)	1/58 (1.7%) ^d
Conventional	50	5.3:1	42.2±2.0	3.7±0.7(43)	1/50 (2%) ^d
Oncocytic variant	8	3:1	64.0±5.6	2.6±0.8(4)	0/8 (0%)
Follicular thyroid carcinoma ^e	24	6.7:1	44.7±4.0	3.5±0.4(21)	0/24 (0%)
Conventional ^e	15	13:1	40.6±3.5	3.7±0.6(14)	0/15 (0%)
Oncocytic variant	9	3.5:1	56.4±10.6	3.2±0.5(7)	0/9 (0%)
Mucoepidermoid carcinoma	12	3:1	31.4±7.0	Not available	0/12 (0%)
Papillary thyroid carcinoma ^e	176	7.3:1	40.5±1.4	2.7±0.2 (129)	55/176 (31.3%)
Conventional PTC	72	5.3:1	37.2±2.1	3.2±0.3(49)	33/72(45.8%)
Follicular variant of PTC	54	12.5:1	41.5±2.6	2.7±0.2(46)	4/54(7.4%) ^d
Oncocytic variant of PTC	22	9:1	45.7±2.9	3.5±0.7(12)	6/22 (27.3%)
Conventional pattern	11	8:1	46.6±3.5	2.6±0.5 (8)	6/11(54.5%)
Follicular pattern	11	10:1	44.9±4.5	5.2±1.4(4)	0/11(0%)
Warthin-like PTC ^e	8	7:0	50.1±4.5	1.7±0.3(7)	6/8(75%)
Microcarcinoma (PTC)	20	8:1	49.8±3.2	0.5±0.1(15)	6/20(30%)
Conventional pattern	14	13:1	45.7±3.1	0.5±0.1(13)	6/14(42.9%)
Follicular pattern	6	5:1	53.2±7.8	0.4±0.2 (2)	0/6(0%)

^aThere were 25 patients with two independent lesions and five with three independent lesions

^bNumber of cases analysed in each category within brackets

^cNA not applicable

^dThe BRAF^{K601E} mutation was detected in one follicular adenoma and in four cases of follicular variant of PTC

^eIn a follicular carcinoma and a Warthin-like PTC the data on patients' gender and age were not available

and an ABI prism 3100 Genetic Analyser (Perkin-Elmer). Sequencing was performed on both strands using the aforementioned primers.

Statistical analysis The results are expressed as a percentage or mean±SE. Statistical analysis was performed both on the whole series and considering the different groups of lesions. For the analysis of the relationship between patients' age and *BRAF* status of the tumours, we used the unpaired *t*-test and ANOVA. Fisher's exact test was used in the statistical analysis of the other parameters. Results were considered statistically significant whenever $P < 0.05$, and suggestively different whenever $P < 0.1$.

Ethics statement Local ethical guidelines appropriate to each country were followed in this study.

Results

The age of the patients and, less obviously, their gender, differed according to the histotypes of the tumours (Table 1). Regarding age, patients with tumours exhibiting oncocytic (Hürthle cell) features were consistently older than patients presenting their non-oncocytic tumour counterparts (follicular adenoma: 64.0 years versus 42.2 years $P = 0.001$; follicular carcinoma: 56.4 years versus 40.6 years $P = 0.16$; conventional PTC: 46.6 years versus 37.2 years $P = 0.11$; and follicular variant of PTC: 44.9 years

versus 41.5 years $P = 0.56$, respectively). Patients with Warthin-like PTC (50.1 years) were suggestively older ($P = 0.06$) than those with conventional PTC (37.2 years). Finally, patients with conventional PTC were younger (37.2 years), though not significantly ($P = 0.13$), than those with follicular variant of PTC (42.1 years).

With regard to gender, the most impressive difference concerned the higher predominance of women in patients with follicular variant of PTC (12.5:1) than in patients with conventional PTC (5.3:1), although this difference did not reach the threshold of statistical significance ($P = 0.18$) (Table 1).

No significant differences were observed in the prevalence of *BRAF* mutations in the comparison of the cases from the seven institutions (data not shown).

The BRAF^{V600E} mutation was detected in conventional PTC (46%), Warthin-like PTC (75%), and in oncocytic variant of PTC and microcarcinoma with papillary or mixed follicular/papillary architecture (55% and 43%, respectively) (Table 1).

The BRAF^{K601E} mutation was only detected in the follicular adenoma previously reported [22] and in four out of 54 cases of the follicular variant of PTC (7%) (Table 1).

No *BRAF* mutations (V600E, K601E) were detected in any nodular goiter, any of the additional cases of follicular adenoma, nor in any follicular carcinoma (Table 1).

No mutations in exon 11 were detected in any case.

In Table 2, we have summarized the data concerning the 14 cases having more than one independent lesion in which

Table 2 Histological classification of the lesions in 14 patients presenting two or three independent lesions with and without *BRAF* mutations

Case	Carcinoma	<i>BRAF</i>
1	Papillary microcarcinoma (conventional)	V600E
	Oncocytic variant of PTC (conventional)	Wild-type
	Mucoepidermoid carcinoma	Wild-type
2	Nodular goiter	Wild-type
	Oncocytic variant of PTC (conventional)	V600E
3	Nodular lymphocytic thyroiditis	Wild-type
	Conventional PTC	V600E
4	Papillary microcarcinoma (conventional)	Wild-type
	Papillary microcarcinoma (conventional)	V600E
5	Nodular goiter	Wild-type
	Conventional PTC	Wild-type
	Conventional PTC	V600E
6	Nodular goiter	Wild-type
	Conventional PTC	V600E
7	Nodular goiter	Wild-type
	Oncocytic variant of PTC (conventional)	V600E
8	Nodular lymphocytic thyroiditis	Wild-type
	Nodular goiter	Wild-type
	Conventional PTC	V600E
9	Follicular variant of PTC	Wild-type
	Papillary microcarcinoma (conventional)	V600E
	Warthin-like PTC	V600E
10	Nodular lymphocytic thyroiditis	Wild-type
	Papillary microcarcinoma (conventional)	Wild-type
	Conventional PTC	V600E
11	Follicular carcinoma	Wild-type
	Warthin-like PTC	V600E
12	Nodular goiter	Wild-type
	Warthin-like PTC	V600E
13	Nodular lymphocytic thyroiditis	Wild-type
	Conventional PTC	V600E
14	Mucoepidermoid carcinoma	Wild-type
	Conventional PTC	V600E

at least one of them had a *BRAF*^{V600E} mutation. No *BRAF*^{V600E} mutations were detected in the “normal” thyroid parenchyma adjacent to PTC, regardless of the presence or absence of *BRAF*^{V600E} mutation in the tumours (data not shown). We also did not detect any *BRAF*^{V600E} mutation in any of the six cases of nodular lymphocytic thyroiditis adjacent to PTC, despite the existence of this mutation in four of the latter (Table 2). The same holds true regarding seven nodular goiters adjacent to *BRAF*^{V600E} positive PTC, as well as two mucoepidermoid carcinomas and one follicular carcinoma that coexisted with *BRAF*^{V600E} mutated PTC (Table 2). In the 20 cases in which more than one sample of the same lesion was screened, the same *BRAF* status was found in all the samples.

In Table 3 we have summarized the gender ratio and mean age±SE of the patients with conventional or follicular variant of PTC, as well as the mean size±SE of the tumours, and the percentage of multicentricity, vascular

invasion, extra-thyroid extension and lymph node metastasis of the cases according to the presence or absence of *BRAF* mutation.

The mean age of the patients with conventional PTC with *BRAF*^{V600E} (46.7 years) was significantly higher ($P<0.0001$) than that of patients with conventional PTC without *BRAF* mutation (29.5 years) (Table 3). In Fig. 1 we have summarized the distribution of cases of conventional PTC according to the age of patients and presence or absence of *BRAF*^{V600E} mutation.

The cases of conventional PTC with *BRAF*^{V600E} were less often multicentric (44%) than cases without *BRAF* mutation (82%) ($P=0.04$). The size of the tumours and the percentage of vascular invasion, extra-thyroid extension and lymph node metastasis were similar in conventional PTC with and without the *BRAF*^{V600E} mutation (Table 3).

No significant differences in the gender ratio, mean age, multicentricity, vascular invasion, extra-thyroid extension and lymph node metastasis were found in the follicular variant of PTC (Table 3) nor in the groups with oncocytic variant of PTC and Warthin-like PTC (data not shown).

Discussion

The study of this large series confirms that the *BRAF*^{V600E} mutation is not detected in any type of benign lesion or well differentiated carcinoma of the thyroid but PTC [6, 9, 13, 22, 26]. However, our series of PTC associated to lymphocytic thyroiditis is too small (six cases) to rule out definitively the occurrence of *BRAF* mutations in this particular setting.

The *BRAF*^{V600E} mutation was not detected in any case of the oncocytic variants of follicular adenoma or follicular carcinoma, in contrast to its frequent occurrence in cases of the oncocytic variant of PTC. This finding supports the classification of the oncocytic carcinomas of the thyroid as variants of the corresponding histological types, instead of their grouping under the general term of “oncocytic carcinoma” [24]. This is in agreement with the results of Cheung and colleagues [5] and Belchetz and colleagues [2], who detected RET/PTC rearrangements in cases of the oncocytic variant of PTC, but not in the oncocytic variant of follicular carcinoma.

The present study confirms the close relationship between the occurrence of *BRAF*^{V600E} and the architecture of the PTC [24]. The mutation appears to be mostly or exclusively detected in PTC exhibiting a papillary or mixed follicular/papillary growth pattern, regardless of being a conventional PTC or any of the PTC variants (Warthin-like, oncocytic variant and microcarcinoma).

Despite the substantial increase in the number of cases of the follicular variant of PTC and of the oncocytic variant of PTC with a follicular pattern of growth, we did not detect any *BRAF*^{V600E} mutation in these histotypes: 0/54 (0%) in the follicular variant of PTC and 0/11 (0%) in cases of the oncocytic counterpart, in contrast to 33/72 (45.8%) in conventional PTC and 6/11 (54.5%) in the oncocytic variant of PTC with a conventional pattern of growth.

Table 3 Distribution of gender, age, size, multicentricity, vascular invasion, extra-thyroid extension and lymph node metastasis of the patients with conventional PTC and follicular variant of PTC according to tumour histotype and *BRAF* status

Histotype	Clinicopathologic feature	<i>BRAF</i> ^{WT†}	<i>BRAF</i> ^{mut†}	<i>P</i> -value
Conventional PTC (72 tumours in 69 patients)	Gender (♀:♂)	8.5:1 (38)	3.4:1 (31)	0.20
	Age (mean years±SE)	29.5±2.4 (38)	46.7±2.8 (31)	<0.0001
	Size (mean cm±SE)	3.1±0.4 (29)	3.2±0.4 (20)	0.82
	Multicentricity (positive/total)	0.82 (17)	0.44 (18)	0.04
	Vascular involvement (positive/total)	0.56 (17)	0.32 (18)	0.19
	Extra-thyroid extent (positive/total)	0.42 (17)	0.37 (18)	>0.9999
	Lymph node metastases (positive/total)	0.69 (17)	0.62 (18)	>0.9999
Follicular variant of PTC (54 tumours in 54 patients)	Gender (♀:♂)	15.7:1 (50)	3:1 (4)	0.27
	Age (mean years±SE)	42.7±2.6 (50)	34.8±6.7 (4)	0.40
	Size (mean cm±SE)	2.8±0.3 (42)	2.0±0.3 (4)	0.33
	Multicentricity (positive/total)	0.36 (36)	0.00 (3)	0.54
	Vascular involvement (positive/total)	0.19 (36)	0.00 (3)	>0.9999
	Extra-thyroid extent (positive/total)	0.08 (36)	0.00 (3)	>0.9999
	Lymph node metastases (positive/total)	0.17 (36)	0.00 (3)	>0.9999

†Number of cases analysed in each category within brackets

We found an additional case of the follicular variant of PTC with the *BRAF*^{K601E} mutation, thus leading to an overall percentage of 7.4% of follicular variant of PTC with this genetic alteration. With the exception of its detection in two follicular adenomas, one included in the present series and another from a different study in post-Chernobyl tumours [11], the *BRAF*^{K601E} mutation was not detected in any of the remaining 57 follicular adenomas, 39 nodular goiters and 24 follicular carcinomas. It was not also detected in any case of mucoepidermoid carcinoma or in any PTC histotype other than the follicular variant of PTC.

Altogether, our findings show that there is an association between two morphological types of a single entity (PTC with papillary or mixed follicular/papillary architecture and PTC with a follicular growth pattern) and two missense mutations of the *BRAF* gene (V600E and K601E).

Our data demonstrate, furthermore, the molecular singularity of the follicular variant of PTC, as Zhu and colleagues [27] had already shown with regard to the high prevalence of *Ras* mutations. These two findings support the existence of a molecular counterpart for the so-called hybrid follicular/papillary carcinoma [1, 4]. It seems also

challenging to search for *BRAF* mutations in PTC apparently arising on pre-existing follicular adenomas [25].

The absence of *BRAF*^{V600E} mutations in cases of the follicular variant of PTC and of the oncocytic variant of PTC with a follicular pattern of growth, which are much more frequent in women than in men (12.5:1 and 10:1 ♀:♂, respectively), explains why the different histotype composition of the different series may obscure the association between male gender and occurrence of the *BRAF* mutation (Table 3) [8, 13, 15, 17, 26].

The same holds true (influence of the histotype composition of the series) regarding the association between age of the patients and *BRAF* mutated tumours. Like Xu and colleagues [26] and Nikiforova and colleagues [15], we observed that patients with PTC lesions harbouring the *BRAF*^{V600E} mutation are older than those presenting PTC lesions with wild-type *BRAF* (*P*=0.004). This age unbalance is substantially increased (more 17.2 years in average) when the comparison is restricted to patients with conventional PTC (*P*<0.0001).

The significantly older age of patients with conventional PTC displaying *BRAF*^{V600E} (*P*<0.0001) indicates that

Fig. 1 Distribution of the age of 69 patients with conventional PTC with wild-type *BRAF* (□) and with the *BRAF*^{V600E} mutation (■)*. *Patients with more than one tumour were considered only once: if any of the tumours was *BRAF* positive (*BRAF*^{V600E}) the patient was included in the “mutated” group

either the tumours with the mutation start their neoplastic development (initiation and/or early phase of promotion) in older individuals or, having started in a similar age period, progress slower than PTC without the mutation. The latter hypothesis fits with the possibility that the $BRAF^{V600E}$ mutation provides a less efficient tumourigenic stimulus to the thyrocytes than other genetic alterations, such as RET/PTC rearrangements. This possibility (i.e. weak tumourigenic stimulus of $BRAF$ mutation) is supported by the findings of rare $BRAF$ mutations in childhood PTC [11, 14], at variance with the younger age of patients with PTC associated to RET/PTC rearrangement [20, 23].

The $BRAF$ mutated PTC of our series did not exhibit signs of clinical aggressiveness (size, vascular invasion, extra-thyroid extension and lymph node metastasis). The only difference between cases with and without $BRAF$ mutation concerned the frequency of multicentric lesions, which was actually higher in conventional PTC without the mutation. Our data contrast with those of other groups [8, 13, 15, 26], who reported a positive association between $BRAF$ mutations and tumour staging. As with age and gender, we think the different types and prevalence of $BRAF$ mutations in the different PTC histotypes may contribute to explain this discrepancy.

Taken together, our results fit with the concept that $BRAF$ mutations do not appear to confer per se a strong stimulus for neoplastic development in the thyroid. This does not mean, however, that PTC with $BRAF$ mutation cannot progress towards less differentiated carcinomas, since our group, and others [13, 15, 21] have detected the $BRAF^{V600E}$ mutation in 10–35% of undifferentiated carcinomas of the thyroid.

Acknowledgements We thank Drs. Valeriano Leite and Xavier Matias-Guiu for having provided material from their hospitals. We are also grateful to Fundação para a Ciência e Tecnologia for grant support to Vitor Trovisco, Ana Preto, Jorge Lima, Patrícia Castro, Valdemar Máximo, Tiago Botelho, Severina Moreira and Ana Margarida Meireles.

References

- Baloch ZW, LiVolsi VA (2002) Etiology and significance of the optically clear nucleus. *Endocr Pathol* 13:289–299
- Belchetz G, Cheung CC, Freeman J, Rosen IB, Witterick IJ, Asa SL (2002) Hurthle cell tumors: using molecular techniques to define a novel classification system. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128:237–240
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL (2002) $BRAF$ and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62:6997–7000
- Castro P, Fonseca E, Magalhaes J, Sobrinho-Simoes M (2002) Follicular, papillary, and “hybrid” carcinomas of the thyroid. *Endocr Pathol* 13:313–320
- Cheung CC, Ezzat S, Ramyar L, Freeman JL, Asa SL (2000) Molecular basis of hurthle cell papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 85:878–882
- Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D (2003) $BRAF$ mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95:625–627
- 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 (2002) Mutations of the $BRAF$ gene in human cancer. *Nature* 417:949–954
- Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY (2004) Mutations of the $BRAF$ gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 45:818–821
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA (2003) 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* 63:1454–1457
- Kumar R, Angelini S, Snellman E, Hemminki K (2004) $BRAF$ mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 122:342–348
- Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D, Sobrinho-Simoes M (2004) $BRAF$ mutations are not a major event in post-hereditary childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4267–4271
- LiVolsi V (1990) Surgical pathology of the thyroid. Saunders, Philadelphia
- Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S (2003) Clinical implication of hot spot $BRAF$ mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4393–4397
- Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, Thomas GA, Jeremiah S, Bogdanova TI, Tronko MD (2004) Low prevalence of $BRAF$ mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett* 209:1–6
- 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 (2003) $BRAF$ mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5399–5404
- Peyssonnaud C, Eychene A (2001) The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93:53–62
- 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, Santeusano F (2004) $BRAF^{V599E}$ mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2414–2420
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934
- Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA (1992) Tumours of the thyroid gland. Armed Forces Institute of Pathology, Washington
- Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simoes M (1998) Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 185:71–78

21. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijao T, Rebocho AP, Fonseca E, Vieira de Castro, I, Cameselle-Teijeiro J, Cardoso-Oliveira M, Sobrinho-Simoes M (2004) BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Arch* 444:572–576
22. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M (2003) BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578–4580
23. Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, Carcangiu ML, Fusco A (1998) RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res* 4:287–294
24. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simoes M (2004) BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 202:247–251
25. Vickery AL Jr, Carcangiu ML, Johannessen JV, Sobrinho-Simoes M (1985) Papillary carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 2: 90–100
26. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA (2003) High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 63:4561–4567
27. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE (2003) Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 120:71–77

APÊNDICE E

PAX8-PPAR γ Rearrangement Is Frequently Detected in the Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma

P. Castro, A. P. Rebocho, R. J. Soares, J. Magalhães, L. Roque, V. Trovisco, I. Vieira de Castro, M. Cardoso-de-Oliveira, E. Fonseca, P. Soares, and M. Sobrinho-Simões

Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (P.C., A.P.R., R.J.S., J.M., V.T., M.C.-d.-O., E.F., P.S., M.S.-S.), 4200-465 Porto, Portugal; Department of Pathology (J.M., E.F., P.S., M.S.-S.), Medical Faculty of Porto, 4200-319 Porto, Portugal; Centro de Investigação de Patobiologia Molecular (L.R.), Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, 1070 Lisboa, Portugal; Department of Pathology (I.V.d.C.), Medical Faculty, University of São Paulo, 05509-900 São Paulo, Brazil; and Department of Surgery (M.C.-d.-O.), Medical Faculty of Porto, 4200-319 Porto, Portugal

Context: The clinicopathological characteristics and the molecular features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma (FVPTC) remain controversial.

Objective/Design/Patients: In an attempt to clarify such controversies and to find whether or not FVPTC cases share the molecular features of follicular tumors, we searched for the presence of PAX8-PPAR γ rearrangements, RAS mutations, and RAP-1, RAF-1, and BRAF mutations in a series of 40 FVPTCs as well as in 27 follicular thyroid carcinomas (FTCs) and 12 follicular thyroid adenomas (FTAs). Fluorescence *in situ* hybridization and RT-PCR were used to detect the PAX8-PPAR γ rearrangement and PCR, single strand confirmational polymorphism, and sequencing for searching the mutations.

Results: The frequency of PAX8-PPAR γ rearrangement was similar in FVPTCs (37.5%), FTCs (45.5%), and FTAs (33.3%). The same holds true regarding the frequency and type of RAS mutations: FVPTC,

25.0%; FTC, 22.2%; and FTA, 33.3%. BRAF mutations were only detected in FVPTC (10%); the BRAF mutations in these cases (K601E and G474R) are different from the typical BRAF^{V600E} mutation of conventional PTCs. No mutations were detected in RAP-1 and RAF-1. In FVPTCs, the PAX8-PPAR γ rearrangement was significantly associated with multifocality and vascular invasion, whereas the RAS mutations were significantly associated with the large tumor size. There were three cases of FVPTC, three FTCs and one FTA, harboring both PAX8-PPAR γ rearrangement and RAS mutations; patients with such tumors were usually very young.

Conclusions: We conclude that a subset of FVPTC shares some of the molecular features of follicular tumors. Further studies are necessary to clarify the putative clinical significance (*e.g.* association to blood-born metastases) of PAX8-PPAR γ rearrangement, RAS mutations, and BRAF^{K601E} in FVPTCs. (*J Clin Endocrinol Metab* 91: 213–220, 2006)

THE VAST MAJORITY of thyroid neoplasms are well-differentiated tumors that originate from follicular cells. These tumors can be subdivided, based on histological characteristics, in benign [follicular thyroid adenoma (FTA)] and malignant papillary thyroid carcinoma (PTC) and follicular thyroid carcinoma (FTC).

PTCs are frequently multifocal, give rise to lymph node metastases, and carry an overall survival rate exceeding 90% after 10 yr (1–3). In contrast, FTCs are usually unifocal and encapsulated, tend to give rise to blood-born metastases, and carry a lower overall survival rate (1–3).

Cytologically, PTCs display characteristic nuclear changes (1–3). Tumors with the typical nuclear features of PTC that have a predominant or exclusive follicular growth pattern are classified as follicular variant of PTC (FVPTC) (3).

FVPTC cases, like most conventional PTCs, are slowly growing neoplasms that tend to give rise to lymph node

metastases (1–3). In 1985, Carcangiu *et al.* (4) pointed out that, at variance with conventional PTC, some FVPTC cases were prone to give rise to lung metastases. It was observed, moreover, that the growth pattern of the encapsulated form of the FVPTC—there are two other forms of FVPTC in which the tumor growth pattern is poorly circumscribed or diffuse/multinodular and widely invasive (5–7)—mimicked that of FTC, pushing borders and signs of capsular and/or vascular invasion (1–4, 8–9). Baloch and LiVolsi (9) showed that these encapsulated FVPTCs may give rise to blood-born metastases in the absence of lymph node metastases.

It has been shown recently that FVPTC cases have a high percentage of RAS mutations (43%), which is similar to that observed in FTC (10), and contrasts with conventional PTC, in which such mutations were rarely detected (0–23%) (10–14).

The type and prevalence of BRAF mutations differ in FVPTCs from those detected in conventional PTCs (15). Conventional PTCs are characterized by the prevalent occurrence of BRAF^{V600E} (46%) (15), whereas FVPTC cases have a different and less prevalent (10%) type of mutation (K601E) (15).

The PAX8-PPAR γ fusion gene has been detected in a high percentage of FTCs (16) and, later on, also in FTAs by several groups (17–20). This fusion gene has not been detected in normal thyroid or nodular goiter, nor in any histological type of PTC (16, 17, 20). Despite this apparent specificity, Roque

First Published Online October 11, 2005

Abbreviations: BAC, Bacterial artificial chromosome; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; FTA, follicular thyroid adenoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; FVPTC, follicular variant of PTC; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PTC, papillary thyroid carcinoma; SSCP, single strand confirmational polymorphism.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

et al. (21) had described, using conventional cytogenetics, the t(2,3)(q13;p25) in one case of FVPTC. Moreover, Wreesmann *et al.* (22), using immunohistochemistry, demonstrated overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in three cases of FVPTC; in one of these cases, the presence of rearranged PPAR γ was detected by Southern blot (22). Finally, we have detected recently, in a preliminary study, the presence of the PAX8-PPAR γ rearrangement in four of eight cases of FVPTC (23).

In an attempt to find whether or not FVPTC cases share some of the molecular features of follicular tumors, we searched for the presence of PAX8-PPAR γ rearrangements, RAS mutations, and BRAF mutations in a series of 40 cases of FVPTC, as well as in two control series of 27 FTCs and 12 FTAs.

Patients and Methods

All the local ethical guidelines were strictly followed in this study.

The 40 cases of FVPTC included in the present study were exclusively or almost exclusively composed by follicles (papillary structures, if present, were observed in less than 5% of the tumor area; no psammoma bodies were observed in any case). Three of the 40 cases were composed by oxyphilic (Hürthle) cells. The diagnosis was based, in every case, on the typical PTC nuclei of the neoplastic cells (1–3). Besides the PTC-like nuclei, the tumors displayed pushing borders (with or without a well-defined capsule) and prominent foci of long and irregular follicles with scalloped colloid (1–3).

The treatment of the patients with FVPTC varied greatly from case to case and only rarely included lymphadenectomy. These limitations preclude the comparison of the cases regarding their lymph node metastatic potential. We also did not make any comparison regarding disease-free interval because the follow-up of most cases is too short. The same holds true for patients with FTC and FTA (see below).

The 39 follicular tumors were diagnosed as FTC ($n = 27$) and FTA ($n = 12$) according to the WHO classification (3). Eighteen of the 27 FTCs and

eight of the 12 FTAs were composed by oxyphilic (Hürthle) cells. All but two FTC were diagnosed as minimally invasive FTC; cases 9 and 20 were diagnosed as widely invasive FTCs (3). There were signs of vascular invasion in 24 of the 27 FTCs; in the remaining three cases, the diagnosis was based upon unequivocal signs of capsular invasion (1–3).

Despite a thorough search, we did not detect vascular or capsular invasion in the 12 cases diagnosed as FTA. The limited number of histological sections available per case and the presence of equivocal signs of capsular and/or vascular invasion in some of the cases of FTA might lead, according to Williams (24), to their classification as follicular tumors of uncertain malignant potential. For the sake of simplicity, we decided to avoid this designation and to stick to the diagnosis of FTA.

Mutation screening

Genomic DNA was extracted from 10- μ m paraffin-embedded tumor sections of 40 FVPTCs, 27 FTCs, and 12 FTAs. Slides were microscopically examined, and tumor areas were marked and carefully dissected under microscopic observation. Dissected material was deparaffinized in xylene, washed in ethanol, and rehydrated. DNA extraction was performed using the Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN) according to the manufacturer's tissue protocol. Sequences of H-RAS (exons 1 and 2), K-RAS (exons 1 and 2), N-RAS (exon 2), BRAF (exon 11 and 15), RAF-1 (exon 15), and RAP-1 (exons 1–6) were amplified using primer pairs listed in Table 1. All these analyses had not been performed previously but for the search of BRAF mutation in 32 cases of FVPTC (15) (Table 2). The PCR mixture (25 μ l) contained 2.5 μ l 10 $\times$ Complete PCR Buffer (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Germany), 1 μ l dNTPs (5 mM each), 0.1 μ g each primer, 0.1–0.5 μ g genomic DNA, and 0.2 U Taq DNA Polymerase (Bioron GmbH). After 10 min of initial denaturation, the PCR mixtures were subjected to 35 cycles of denaturation for 30 sec at 95 C, annealing for 45 sec at variable temperature according to the amplicon (Table 1), and extension for 45 sec at 72 C. A final extension period of 10 min at 72 C was performed to finish the reaction.

PCR products were subjected to a single strand confirmational polymorphism (SSCP) electrophoresis in 0.8% mutation detection enhancement gel to detect possible mutations. Because SSCP analysis was not able to discriminate alterations in exon 2 from N-RAS, this gene was

TABLE 1. Primers, PCR, and SSCP conditions

Gene	Exon	Primer sequence	Length (bp)	PCR annealing temperature (C)	SSCP conditions
K-RAS	1	F-GACTGAATATAAACTTGTGG R-CGAATATGATCCAACAATAG	107	53	180 V, 14 h, 18 C
	2	F-TTCCTACAGGAAGCAAGTAG R-AGATATTCACCATTATAGGTGG	181	54	180 V, 14 h, 18 C
H-RAS	1	F-GAGGAGCGATGACGGAATAT R-TAGAGGTGAGCCTGGCGCC	133	57	180 V, 16 h, 8 C
	2	F-GATTCTCTACCGGAAGCAGGTG R-ACAACACCAAGTCTTTTGAGGA	164	58	180 V, 16 h, 8 C
N-RAS	2	F-GATTCTTACAGAAAACAAGT R-AATACATGAGGACAGGCGAAGG	119	58	Direct sequencing
RAF-1	15	F-TGAGAGCATTCCTGGGCTTTGTT R-AGTTGACTTTGCACCTGTCTTC	191	60	180 V, 16 h, 8 C
BRAF	11	F-TCCCTCTCAGGCATAAGGTAA R-ATCAAAGGAAATATTCAGTGT	313	58	180 V, 16 h, 8 C
	15	F-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA R-TCCACTGATTAAATTTTGGCC	224	58	180 V, 16 h, 8 C
RAP-1	1	F-TCAGATCGTCAGTATTTAAACAGA R-AGTTACAGTTAGGTGGCTAACTT	107	60	180 V, 15 h, 8 C
	2	F-TAATTTGTAGGTTAAGTAACATTCA R-TCATAAGGAAGTACTTGTAAGCA	181	57	180 V, 15 h, 8/20 C
	3	F-AGAATGAGATTTTGATGTTACTCT R-ACCTACTCAGATGACAAAACCT	133	60	180 V, 15 h, 8/20 C
	4	F-ATTGTTGCAGTATACATTCAAGAA R-AGAGAGATGGCATAACATCTTAC	164	60	180 V, 15 h, 8 C
	5	F-AAGGCTAAGTAATGAGTATGTTAT R-TGCCCAGCAGTTGTAGGTTA	119	60	180 V, 15 h, 20 C
	6	F-ACCAGAAATAGTACTTACCAGAA R-AGAAAGGCACTTGTCTGCTT	191	58	180 V, 15 h, 8/20 C

TABLE 2. Summary of the clinicopathological and molecular data in 40 cases of FVPTC

Case no.	Gender/age (yr)	Size (cm)	Multifocality	Capsular invasion	Vascular invasion	PAX8-PPAR γ rearrangement ^a	RAS	BRAF ^b
1	F/47	2.5	Yes	Absent	Present	ND	Normal	Normal ^b
2	F/36	3.5	No	Absent	Absent	Rearrangement	Normal	Normal ^b
3	F/35	1.5	Yes	Absent	Absent	ND	Normal	G474R
4	F/47	2.5	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
5	F/61	1.3	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
6	F/33	4.0	No	Present	Absent	Normal	NRAS Q61G	Normal ^b
7	F/34	0.7	Yes	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
8	F/44	1.2	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal
9	M/34	2.8	No	Absent	Absent	Normal	Normal	K601E ^b
10	F/22	2.7	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
11	F/45	5.0	No	Absent	Absent	Normal	HRASQ61R	Normal ^b
12	F/54	9.0	Yes	Present	Absent	Normal	NRAS Q61G	Normal
13	F/40	2.1	No	Absent	Absent	Normal	Normal	Normal ^b
14	F/62	3.0	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
15	F/42	3.0	No	Absent	Absent	Normal	Normal	Normal ^b
16	F/24	2.0	Yes	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal ^b
17	F/55	2.1	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
18	F/45	4.5	No	Absent	Absent	Normal	Normal	Normal ^b
19	F/57	1.0	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal
20	F/27	1.3	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal
21	F/34	2.8	Yes	Absent	Absent	Normal	NRAS Q61G	Normal
22	F/61	1.6	No	Absent	Absent	Normal	NRASQ61G	Normal
23	F/76	1.0	Yes	Absent	Present	Rearrangement	Normal	Normal
24	F/38	2.4	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
25	M/65	4.0	Yes	Absent	Absent	Rearrangement	Normal	Normal ^b
26	M/54	2.0	No	Absent	Absent	Normal ^a	Normal	K601E ^b
27	F/26	2.1	No	Absent	Absent	Normal	Normal	K601E ^b
28	F/53	2.6	Yes	Absent	Absent	Normal	NRAS Q61G	Normal ^b
29	F/50	1.5	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
30	F/67	2.7	No	Present	Absent	Normal ^a	Normal	Normal ^b
31	F/50	1.5	No	Absent	Absent	ND	HRAS Q61G	Normal ^b
32	F/45	4.8	No	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal ^b
33	F/29	2.0	No	Absent	Absent	Normal ^a	Normal	Normal ^b
34	F/50	6.5	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
35	F/41	2.2	No	Absent	Absent	ND	Normal	Normal ^b
36	F/41	6.0	No	Present	Absent	Rearrangement ^a	Normal	Normal ^b
37	F/29	7.0	Yes	Absent	Present	Rearrangement ^a	HRAS Q61R	Normal ^b
38	F/28	2.5	No	Present	Present	Rearrangement ^a	HRAS Q61R	Normal ^b
39	F/55	4.5	Yes	Present	Absent	Rearrangement ^a	NRASQ61G	Normal ^b
40	F/33	2.5	No	Absent	Absent	Normal ^a	Normal	Normal ^b

F, Female; M, male; ND, not determined.

^a Eight cases had been previously analyzed for PAX8-PPAR γ rearrangement (23).^b Most of the cases had been previously analyzed for BRAF mutations (15).

studied by direct sequencing only. Running conditions are discriminated in Table 1. Gels were silver stained, and samples with suspicious bands were purified by enzymatic treatment. Purified samples were sequenced on both strands as follows: 3 μ l purified PCR product was added to 7 μ l sequencing reaction containing 2.7 μ l 2.5 $\times$ Big Dye Buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA), 30 ng primer, and 1 μ l Big Dye terminator version 3.1 cycle (Applied Biosystems). Sequencing was performed in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Mutated samples were reextracted, reamplified, and resequenced to confirm the result.

In every SSCP analysis for the genes K-RAS, H-RAS, and BRAF, a positive control for the mutations was included. Because we did not have a positive control for mutations in *RAP-1* and *RAF-1* genes, we random selected and sequenced 10 FVPTCs and five FTCs for control purposes.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH was performed on isolated nuclei extracted from 50- μ m paraffin-embedded sections of 24 cases of FVPTC, 22 cases of FTC, nine cases of FTA, five samples of normal thyroid parenchyma (from five cases of FVPTC), two cases of conventional PTC, and four PTC-derived cell lines. Eight of the 24 FVPTC cases had been previously studied (23)

(Table 2). Bacterial artificial chromosome (BAC) probes for PPAR γ (RPC1130 G23, BAC PAC Resources; Alfagene, Carcavelos, Portugal) and PAX8 (RPC1165 I12, BAC PAC Resources) were used following the procedure of Marques *et al.* (25); the study was performed in the laboratory of Marques *et al.* (25) under the supervision of L. Roque, who is a coauthor of both papers. Briefly, PPAR γ BAC clone DNA was labeled with digoxigenin and PAX8 BAC clone DNA with biotin by random priming, using the Bioprime DNA labeling system (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain). Nuclear suspensions were spotted on SuperFrost Slides (Menzel-Glaser, GmbH, Memmert, Germany) and pretreated with 0.1% pepsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in 0.2% HCl at 37 C. Probe mixture in 50% formamide in 2 $\times$ sodium saline citrate was co-denatured with the nuclear DNA at 80 C for 2 min. Detection of digoxigenin-labeled PPAR γ probe was accomplished using an antidigoxigenin fluorescein antibody (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and the biotinylated-labeled PAX8 probe with CY₃-avidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole-Vectashield mounting solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescence hybridization signals were then analyzed and recorded with a Cytovision System (Applied Imaging, New Castle, UK). For each case, 200 intact non-

overlapping nuclei were counted. Nuclei in which the two probes were fused or touched were scored as positive for fusion gene.

RT-PCR

Total RNA was extracted from frozen samples of three tumors of the FVPTC using Tripure isolation reagent (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 1 μ g of RNA at 37 C for 90 min, using oligo (dT) primers and reverse transcriptase (Invitrogen). The presence of the PAX8-PPAR γ fusion gene was searched by RT-PCR as described previously (14).

Statistical analysis

The results are expressed as mean $\pm$ SD (age of the patients and size of the tumors), as percentage, or as absolute values. The χ^2 test with

Yate's correction and the Student's *t* test (unpaired) were used in the statistical analysis of the results. Values were considered significantly different when *P* < 0.05.

Results

In Tables 2 and 3 we have summarized the clinicopathological and molecular data of the 40 cases of FVPTC and those of the 39 follicular tumors (27 FTCs and 12 FTAs).

FVPTC

The mean age $\pm$ SD was 44.4 $\pm$ 13.2 yr, and the mean size $\pm$ SD was 2.9 $\pm$ 1.8 cm. By FISH, we detected the PAX8-PPAR γ

TABLE 3. Summary of the clinicopathological and molecular data in 27 cases of FTC (cases 1–27) and 12 cases of FTA (cases 28–39)

Case no.	Gender/age (yr)	Size (cm)	Capsular invasion	Vascular invasion	Extrathyroid invasion	PAX8-PPAR γ rearrangement	RAS	BRAF
1	F/19	2.2	Present	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
2	F/54	3.0	Absent	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
3	F/75	7.5	Absent	Present	Absent	ND	Normal	Normal
4	F/54	5.1	Present	Present	Absent	Normal	HRAS Q61R	Normal
5	F/86	12.0	Present	Absent	Absent	ND	Normal	Normal
6	F/48	0.8	Present	Present	Absent	ND	Normal	ND
7	M/36	4.0	Present	Absent	Absent	Normal	NRASQ 61G	Normal
8	F/37	4.5	Absent	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
9	M/77	12.0	Absent	Present	Present	Normal	Normal	Normal
10	F/23	1.0	Absent	Present	Absent	Rearrangement	NRASQ 61G	Normal
11	F/49	3.2	Absent	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
12	F/57	12.0	Absent	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
13	F/78		Absent	Present	Absent	ND	Normal	Normal
14	F/32	9.0	Present	Present	Absent	Rearrangement	HRAS Q61R	Normal
15	M/26	7.0	Present	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
16	F/22	3.0	Absent	Present	Absent	ND	Normal	Normal
17	F/57	5.0	Present	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
18	F/59	5.5	Absent	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
19	F/52	5.0	Absent	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
20	F/58	9.0	Present	Present	Present	Normal	NRASQ 61G	Normal
21	F/35	7.0	Absent	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
22	M/41	5.0	Absent	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
23	F/25	1.5	Present	Present	Absent	Rearrangement	NRASQ 61G	Normal
24	F/50	2.7	Absent	Present	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
25	F/69	5.0	Present	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
26	F/38	4.5	Absent	Present	Absent	Normal	Normal	Normal
27	F/68	3.2	Present	Absent	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
28	F/25	3.5	Absent	Absent	Absent	Rearrangement	HRASQ 61R	Normal
29	F/41	1.5	Absent	Absent	Absent	ND	Normal	Normal
30	M/50	4.0	Absent	Absent	Absent	Normal	Normal	Normal
31	F/42	1.0	Absent	Absent	Absent	Normal	Normal	Normal
32	F/27	3.5	Absent	Absent	Absent	ND	Normal	Normal
33	F/41	7.0	Absent	Absent	Absent	Normal	NRASQ 61G	Normal
34	F/51	5.0	Absent	Absent	Absent	ND	NRASQ 61G	Normal
35	F/20	5.0	Absent	Absent	Absent	Rearrangement	Normal	Normal
36	F/45	2.5	Absent	Absent	Absent	Normal	Normal	Normal
37	F/44	2.0	Absent	Absent	Absent	Normal	NRASQ 61G	Normal
38	F/77	6.0	Absent	Absent	Absent	Normal	Normal	Normal
39	M/34	4.0	Absent	Absent	Absent	Rearrangement	Normal	Normal

F, Female; M, male; ND, not determined.

rearrangement in nine of the 24 cases that could be analyzed (37.5%) (Fig. 1 and Table 2). We confirmed the rearrangement, by RT-PCR, in the two cases in which frozen material was available. In five cases of rearranged FVPTC, the adjacent thyroid was analyzed by FISH, and the *PAX8-PPAR γ* rearrangement was not detected in any of the samples. The rearrangement also was not detected in the two cases of conventional PTC or in any of the four PTC-derived cell lines.

The *PAX8-PPAR γ* rearrangement was significantly associated with the presence of multifocality ($P = 0.027$) and vascular invasion ($P = 0.016$). All the cases with vascular invasion, in which *PAX8-PPAR γ* analysis was performed ($n = 3$), had *PAX8-PPAR γ* rearrangement (Table 2). No significant association was found between the presence of *PAX8-PPAR γ* rearrangement and age of patients or size of tumors. We did not observe any consistent morphological difference, namely in the nuclear features, between cases with *PAX8-PPAR γ* rearrangement ($n = 9$) and cases without the rearrangement ($n = 15$).

RAS mutations were detected in 10 of the 40 cases (25%); six of the mutations were in N-*RAS* (Q61G) and four in H-*RAS* (Q61R) (Fig. 2 and Table 2). The cases harboring *RAS* mutations were significantly larger than those with wild-type *RAS* ($P = 0.023$). The presence of *RAS* mutations was not significantly associated with gender, age, multifocality, or invasion.

BRAF mutations were detected in four of the 40 cases (10%) of FVPTC (Fig. 3 and Table 2). In three cases, the mutation was the K601E; in the remaining case, it was a G474R mutation (Table 2). None of the four cases with *BRAF* mutation displayed signs of vascular invasion (Table 2). The presence of *BRAF* mutations was not significantly associated with any of the clinicopathological features. We did not observe any consistent morphological difference, namely in the nuclear characteristics, between cases with *BRAF* mutation ($n = 4$) and cases without mutation ($n = 36$).

The three cases of oxyphilic FVPTC were negative for *PAX8-PPAR γ* rearrangement and *RAS* and *BRAF* mutation. There were three cases of FVPTC harboring both *PAX8-*

FIG. 1. Picture of a positive nucleus for *PAX8-PPAR γ* translocation, stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (case 39). Green dots, BAC probes for *PAPR γ* ; red dots, BAC probes for *PAX8*.

FIG. 2. SSCP and sequencing picture of the H-*RAS* Q61R mutation in a FVPTC case (case 12).

PPAR γ rearrangement and *RAS* mutation (patients with ages of 28, 29, and 55 yr) (Table 2). The *BRAF* mutation did not coexist with any of the other two alterations (Table 2).

No mutations in *RAP-1* and *RAF-1* were detected in any case.

Follicular tumors

The mean age $\pm$ SD of patients with FTC was 49.1 ± 18.8 yr, and the mean age $\pm$ SD of patients with FTA was 41.5 ± 14.9 yr. The mean size $\pm$ SD of FTCs was 5.4 ± 3.2 cm, and the mean size $\pm$ SD of FTAs was 3.4 ± 1.8 cm. By FISH, we detected the *PAX8-PPAR γ* rearrangement in 10 of the 22 cases of FTC (45.5%) and in three of the nine cases of FTA (33.3%) (Table 3). The presence of *PAX8-PPAR γ* rearrangement was significantly associated with younger age of the patients in both FTCs ($P = 0.039$) and FTAs ($P = 0.027$).

RAS mutations were detected in six of the 27 cases of FTC (22.2%), four in N-*RAS* (Q61G), and two in H-*RAS* (Q61R). In FTA, we detected *RAS* mutations in four of the 12 cases (33.3%); three in N-*RAS* (Q61G) and one in H-*RAS* (Q61R) (Table 3). No significant association was observed between the occurrence of *RAS* mutations and any of the clinicopathological features of the cases in the groups of FTC and FTA.

No significant differences were found in any of the markers analyzed in the comparison of FTAs and FTCs with and without oxyphilia (data not shown).

There were four cases harboring *PAX8-PPAR γ* rearrangement and *RAS* mutation; three FTCs and one FTA (Table 3). The FTC patients with both alterations were significantly younger than patients with tumors without any genetic alteration ($P = 0.007$). The single FTA with both genetic al-

FIG. 3. SSCP and sequencing picture of the *BRAF* K601E mutation in a FVPTC case (case 9).

terations (*PAX8-PPAR γ* rearrangement and *RAS* mutation) occurred in a 25-yr-old patient, thus fitting with the young age of patients with both alterations.

No mutations in *BRAF*, *RAP-1*, and *RAF-1* were detected in any follicular tumor (26 FTCs and 12 FTAs).

Comparison between cases of FVPTC and follicular tumors

The frequency of *PAX8-PPAR γ* rearrangement is similar in FVPTCs (37.5%), FTCs (45.5%), and FTAs (33.3%). The frequency of *RAS* mutations is also similar in FVPTCs (25%), FTCs (22.2%), and FTAs (33.3%). The *BRAF* mutation was present in 10% of FVPTCs and was absent from FTCs and FTAs.

Discussion

Our results raise some interesting issues on the putative relationship of FVPTC with FTC and on the implications of the tumors' genotype for our understanding of their phenotype. The first issue concerns the similar prevalence of *PAX8-PPAR γ* in FVPTCs and in follicular tumors. We report, for the first time, a large series of cases of FVPTC in which the *PAX8-PPAR γ* fusion gene has been detected in a high percentage of cases (37.5%). Our data support the preliminary data on record (21–23) and demonstrate that there is a strong association between the occurrence of *PAX8-PPAR γ* rearrangement and the follicular growth pattern even in the setting of PTC. The nuclear features of FVPTC were of the PTC-type regardless of the presence or absence of *PAX8-PPAR γ* rearrangement, thus supporting the assumption that such features probably reflect molecular alterations other than those related to the rearrangement.

The significant association we have found between *PAX8-PPAR γ* and multifocality and vascular invasiveness in the group of FVPTC suggests that the rearrangement confers a higher invasive potential. Furthermore, all the vascular invasive tumors studied for *PAX8-PPAR γ* had the rearrangement. These findings fit with those reported by Nikiforova *et al.* (26) in FTC and indicate that *PAX8-PPAR γ* -positive cases of FVPTC may be prone to give rise to blood-born metastases. The confirmation of this hypothesis requires the study of a large series of cases of FVPTC with and without the rearrangement.

The frequencies of *PAX8-PPAR γ* in FTCs (45.4%) and FTAs (33.3%) are in accordance with the data on record (16–20). Our results are also similar to those reported by Nikiforova *et al.* (26) regarding patients' age; both in FTC and FTA, patients with tumors with *PAX8-PPAR γ* rearrangement were younger than patients with tumors without the rearrangement.

Because the vast majority of FTCs in our series were minimally invasive carcinomas, it was not possible to analyze the putative association of *PAX8-PPAR γ* rearrangement with overtly invasive features of the tumors, as advanced by Nikiforova *et al.* (26).

The second issue concerns the occurrence of *RAS* mutations, which were usually considered to be typical of follicular tumors and relatively rare in PTC (10–14). Recently, a high prevalence (43%) of (N)*RAS* mutations in FVPTC (10) has been reported. We detected *RAS* mutations in about 25%

of the cases in both FVPTC and FTC and a slightly higher percentage in FTA (33.3%), with a predominance, in every group, of N-*RAS* Q61G. These data are in accordance with the data on record (10–14) and show that *RAS* is a target gene both in FVPTC and in follicular tumors and that there is no apparent difference in the frequency of mutations or in the type of mutations in these two types of tumors.

We observed that cases of FVPTC with *RAS* mutations were larger than cases with wild-type *RAS*; this finding concurs with the findings of Nikiforova *et al.* (26) in FTC. The absence of a similar association in our series of follicular tumors may be due to the small size of the sample and to the fact that almost all cases of FTC were minimally invasive carcinomas.

At variance with the advanced rarity of the coexistence of *RAS* mutations and *PAX8-PPAR γ* rearrangement (26), we detected both alterations in 12.5% cases of FVPTCs, 13.6% of FTCs, and 8.3% of FTAs. We observed, furthermore, that the presence of both alterations was significantly associated with a younger age of the patients, favoring that such coexistence may lead to more rapidly growing tumors.

Although it is not yet fully characterized the cellular impact of *PAX8-PPAR γ* in thyroid, it has been advanced that the suppressor role of *PPAR γ* in normal thyroid growth is impaired by the rearrangement (16). The observation that *PAX8-PPAR γ* rearrangements and *RAS* mutations can coexist in the same tumor and that the patients with tumors with *PAX8-PPAR γ* and *RAS* mutation are young suggest that these genetic alterations may have a cumulative effect in the tumorigenic potential and may activate distinct cellular pathways.

The third issue regards the occurrence of *BRAF* mutations. No mutations in *BRAF* hot-spot regions (exons 11 and 15) were detected in any of the follicular tumors. We had already pointed out the rarity of *BRAF* mutations in these tumors (27). Interestingly, in a series of 11 cases of FTA arising in the post-Chernobyl setting, the only case with a *BRAF* mutation had a K601E mutation (28), which is the mutation detected in three cases of FVPTC of the present series. The other *BRAF* mutation (G474R) has not been reported previously in any type of thyroid tumors or in other types of tumor, to the best of our knowledge.

Conventional PTC with papillary or mixed follicular/papillary growth pattern, as well as the tall cell variant, the Warthin-like PTC, and the oncocytic variant of PTC with a predominantly papillary growth pattern, frequently (46–75%) harbor the *BRAF*^{V600E} (15), whereas the FVPTC, besides not harboring the V600E mutation, harbors in about 8% of the cases of the *BRAF*^{K601E}.

Both types of mutations affect the activating segment of the protein, particularly the two adjacent residues (V600 and K601) that are localized between the two major phosphoregulatory residues (T599 and S602) (29). It was shown that the *BRAF*^{V600E} has about 2.5 $\times$ the kinase activity of *BRAF*^{K601E} (30, 31) and that both mutations activate the *BRAF*/MEK/ERK pathway (31). It was also found that the V600E was the only type of *BRAF* mutation detected in 10–35% of poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas harboring *BRAF* mutations (32–35). In summary, there is enough evidence to claim that the two types of *BRAF*

mutation differ from each other both *in vitro* and *in vivo*, but the close phenotype-genotype relationship with regard to the architecture pattern of PTC remains unexplained.

The absence of detectable mutations in *RAP-1* and *RAF-1* genes in any of the tumor groups suggests that these genes are not a major target of mutations in FVPTC or in follicular tumors. These negative results should be taken with caution because we had no positive controls for *RAP-1* and *RAF-1* mutations.

The fourth issue concerns the putative relationship between FVPTC and conventional PTC on one side and FTC on the other. Taking our data on the high frequency of *PAX8-PPAR γ* rearrangement and (N)RAS mutations in FVPTC, together with the data on record on PTC and follicular tumors regarding RAS mutations (10), it seems logical to conclude that some cases of the FVPTC share some of the molecular features of follicular tumors (FTA and FTC).

This conclusion is reinforced by the finding of Wreesmann *et al.* (22) who showed, using comparative genomic hybridization analysis, that the presence and pattern of genomic aberrations in FVPTC were significantly different from those in conventional PTC and similar to those observed in follicular tumors (22).

The comparison of the morphological features of cases of FVPTC with and without *PAX8-PPAR γ* rearrangement, as well as with and without RAS and BRAF mutations, did not yield any discernible differences for diagnostic purposes. Therefore, it does not seem possible to rely upon histopathology for the identification of the subset of FVPTC that shows some of the molecular features of follicular tumors.

We think there is enough evidence to rule out the idea that FVPTC, as a whole, should be considered as a subgroup of conventional PTC (Fig. 4A), and we would favor, taking into consideration the metastatic pattern (4–9) and the molecular features described in the present study, the concept represented schematically in Fig. 4B.

The study of a larger series of FVPTC with long follow-up and detailed data on lymph node and lung metastases is necessary to find out the clinical significance of the occurrence of the three genetic alterations (*PAX8-PPAR γ* rearrangement, RAS mutation, and BRAF^{K601E}) *per se*, or in association, in FVPTC. It will be interesting to find out whether the tendency for blood-born metastases of some FVPTC may be ascribed to a particular molecular profile of the tumors, namely to the presence of *PAX8-PPAR γ* rearrangement (see

above). In the affirmative case, we would suggest that such encapsulated FVPTCs with *PAX8-PPAR γ* rearrangement should be classified, for practical purposes, in the group of FTC rather than as a variant of PTC (Fig. 4C).

Acknowledgments

Received June 16, 2005. Accepted October 4, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. M. Sobrinho-Simões, Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias s/n4200, 465 Porto, Portugal. E-mail: ssimoes@ipatimup.pt.

This work was partially supported by the Portuguese Science and Technology Foundation (Ph.D. Grants SFRH/BD/6816/2001 to P.C. and SFRH/BD/13055/2003 to V.T.) and by additional funding from the same source (Project Programa Operacional Ciência Tecnologia e Inovação/Ciências Biomédicas e Oncológicas/338567/2001).

References

- Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA 1993 Tumors of the thyroid gland (atlas of tumor pathology, 3rd series, fascicle 5). Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology
- Livolsi VA 1990 Surgical pathology of the thyroid. Philadelphia: W.B. Saunders
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, eds 2004 World Health Organization classification of tumors. pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon, France: IARC Press
- Carcangiu M, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J 1985 Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy. Cancer 55: 805–828
- Ivanova R, Soares P, Castro P, Sobrinho-Simões M 2002 Diffuse (or multinodular) follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of ten cases of an aggressive form of differentiated thyroid carcinoma. Virchows Arch 440:418–424
- Castro P, Fonseca E, Magalhães J, Sobrinho-Simões M 2002 Follicular, papillary, and “hybrid” carcinomas of the thyroid. Endocr Pathol 13:313–320
- Sobrinho-Simões M, J Magalhães J, Fonseca E, Amendoeira I 2005 Diagnostic pitfalls of thyroid pathology. Curr Diagn Pathol 11:52–59
- Chem KY, Rosai J 1977 Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases. Am J Surg Pathol 1:123–130
- Baloch ZW, LiVolsi VA 2000 Encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma with bone metastases. Mod Pathol 13:861–865
- Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE 2003 Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. Am J Clin Pathol 120:71–77
- Namba H, Rubin SA, Fagin JA 1990 Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. Mol Endocrinol 4:1474–1479
- Oyama T, Suzuki T, Hara F, Iino Y, Ishida T, Sakamoto A, Nakajima T 1995 N-ras mutation of thyroid tumor with special reference to the follicular type. Pathol Int 45:45–50
- Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE 1999 Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. Clin Endocrinol (Oxf) 50:529–535
- Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JE, de Micco C 2003 Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab 88:2745–2752
- Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhães J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simões M 2004 BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. J Pathol 202:247–251
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA 2000 PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. Science 289:1357–1360
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V 2002 Expression of PAX8-PPAR γ 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. J Clin Endocrinol Metab 87:3947–3952
- Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Phillips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG 2003 Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. J Clin Endocrinol Metab 88:354–357
- Lacroix L, Mian C, Barrier T, Talbot M, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM 2004 PAX8 and peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 gene expression status in benign and malignant thyroid tissues. Eur J Endocrinol 151:367–374
- Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE 2002 PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. Am J Surg Pathol 26:1016–1023

FIG. 4. Schematic representation of the putative relationship between FVPTC and the two main histotypes of thyroid carcinoma (PTC and FTC).

21. Roque L, Nunes VM, Ribeiro C, Martins C, Soares J 2001 Karyotypic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Cancer* 92:2529–2538
22. Wreesmann VB, Ghossein RA, Hezel M, Banerjee D, Shaha AR, Tuttle RM, Shah JP, Rao PH, Singh B 2004 Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: genome-wide appraisal of a controversial entity. *Genes Chromosomes Cancer* 40:355–364
23. Castro P, Roque L, Magalhães J, Sobrinho-Simoes M 2005 A subset of follicular variant of papillary carcinoma harbors PAX8-PPAR γ translocation. *Int J Surg Pathol* 13:235–238
24. Williams ED 2000 Guest editorial: two proposals regarding the terminology of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 8:181–183
25. Marques AR, Espadinha C, Frias MJ, Roque L, Catarino AL, Sobrinho LG, Leite V 2004 Underexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in PAX8/PPAR γ -negative thyroid tumours. *Br J Cancer* 91:732–738
26. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE 2003 RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318–2326
27. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M 2003 BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578–4580
28. Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D, Sobrinho-Simoes M 2004 BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4267–4271
29. Chong H, Lee J, Guan KL 2001 Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J* 20:3716–3727
30. 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 2002 Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949–954
31. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R 2004 Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855–867
32. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S 2003 Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4393–4397
33. 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 2003 BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5399–5404
34. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijao T, Rebocho AP, Fonseca E, Vieira de Castro I, Cameselle-Teijeiro J, Cardoso-Oliveira M, Sobrinho-Simoes M 2004 BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Arch* 444:572–576
35. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA 2003 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* 63:1454–1457

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Federation of American Societies for Experimental Biology

Executive Director/Chief Operating Officer

The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) invites applications for the position of Executive Director.

Located in Bethesda, MD, FASEB is a coalition of 23 independent Member Societies representing the interests of biomedical and life scientists. The purposes of the Federation are to bring together investigators in biological and medical sciences represented by the Member Societies; to disseminate information on the results of biological research through publications and scientific meetings; and to serve in other capacities in which the Member Societies can function more efficiently as a group than as individual units.

The Executive Director reports directly to the President/Board and is the chief operating officer of the corporation, responsible for implementing business, financial, publication, advisory, public relations, educational, and other programs and policies approved by the Board. He/she provides leadership and direction to approximately 90 professional, technical and clerical support staff and manages an annual operating budget of \$15.5 million.

Qualified applicants should have executive/administrative experience with a record of achievement and leadership in academic, association or other non-profit organizations. Candidates will have proven administrative and leadership capabilities, excellent interpersonal and communication skills, knowledge and understanding of the legislative process, public policy, knowledge of current trends/issues facing the biological and life sciences, and a strong sense of diplomacy. An advanced degree (Ph.D., M.D., M.B.A.,) is highly desirable.

Qualified candidates should send resume, cover letter and references (electronic attachments preferred) to: hr@faseb.org or mail application materials to:

FASEB President
Attn: Human Resources
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814

To view a complete job description visit our web site at: <http://www.faseb.org/hr/employ.html>.

FASEB is an Equal Opportunity Employer.