



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
NEUROCIÊNCIAS**

**INVESTIGAÇÃO DE OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES MOLECULARES
NOS GENES *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* E *BRAF* EM CARCINOMA PAPILÍFERO
DA TIREOIDE**

CLEBSON PANTOJA PIMENTEL

Belém - Pará

Mai de 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
NEUROCIÊNCIAS**

**INVESTIGAÇÃO DE OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES MOLECULARES
NOS GENES *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* E *BRAF* EM CARCINOMA PAPILÍFERO
DA TIREOIDE**

CLEBSON PANTOJA PIMENTEL

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Neurociências da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira.

Belém – Pará

Mai/2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

P644i Pimentel, Clebson Pantoja

Investigação de ocorrência de alterações moleculares nos genes KRAS, HRAS, NRAS e BRAF em carcinoma papilífero da tireoide / Clebson Pantoja Pimentel. — 2018
62 f. : il. Color

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira

1. Glândula tireoide - câncer - Belém (PA). 2. Genes - mutação. 3. Carcinogênese - Belém (PA). 4. Glândulas endócrinas - câncer - aspectos genéticos. 5. Glândula tireoide - doenças - Belém (PA). I. Oliveira, Edivaldo Herculano Corrêa de, *orient.* II. Título

CDD 616.44



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
NEUROCIÊNCIAS**

**INVESTIGAÇÃO DE OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES MOLECULARES
NOS GENES KRAS, HRAS, NRAS E BRAF EM CARCINOMAS PAPILÍFERO
DA TIREOIDE**

CLEBSON PANTOJA PIMENTEL

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira
Universidade Federal do Pará (UFPA) - Orientador

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Universidade Federal do Pará (UFPA) – Avaliador

Profa. Dra. Ciane Martins de Oliveira
Centro Universitário do Pará (CESUPA) - Avaliadora

Dr^a Fernanda do Espírito Santo Sagica
Instituto Evandro Chagas (IEC) - Avaliadora

Belém – Pará

Maio/2018

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E AGÊNCIAS FINANCIADORAS

- Instituto Evandro Chagas (IEC)
 - ✓ Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética

- Universidade Federal do Pará (UFPA)
 - ✓ Laboratório de Erros Inatos do metabolismo (LEIM)

- Hospital Universitário João de Barros Barreto (UUJBB)

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

AGADECIMENTOS

Aos meus pais (Alzira de Jesus Barra Pimentel e Raimundo Valente Pimentel Filho) e irmãos (Ronaldo, Rosilene, Márcio, Lucicléia, Celeste e Ailton), os quais são fontes de carinho e apoio em todos os momentos.

Ao estimado professor Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira, pela orientação permanente, apoio nos momentos decisivos e por sua amizade de anos.

Aos professores Erik Artur Cortinhas Alves e Luiz Carlos Santana da Silva pela contribuição técnica e suporte estrutural.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas (SAMAM-IEC), e do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Ao Dr. Samir Mansour Moraes Casseb, pela contribuição na realização da técnica de sequenciamento automático direto.

Ao médico cirurgião de cabeça e pescoço, Alberto Kato, pela coleta do material biológico.

Aos pacientes, pela cooperação e participação neste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A GLÂNDULA TIREOIDE	13
1.2. ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DA TIREOIDE	15
1.2.1. Carcinoma Papilífero da Tireoide	16
1.3. DIAGNÓSTICO DE TUMORES DA TIREOIDE	17
1.4. BIOLOGIA MOLECULAR DOS TUMORES DA TIREOIDE	18
1.4.1 Família de Genes <i>RAS</i> e <i>BRAF</i>	19
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 CASUÍSTICA	31
4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	31
4.3. ASPECTOS CLINICOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES	32
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	32
4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	32
4.6 AMPLIFICAÇÕES DOS FRAGMENTOS DOS GENES DE INTERESSE	32
4.7 IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS SEGMENTOS ESTUDADOS	34
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS	50

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATC	Carcinoma Anaplásico da Tireoide
BFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
BRAF	<i>v-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
CDT	Carcinoma Diferenciado da Tireoide
CIT	Carcinoma Indiferenciado da Tireoide
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ERK	Cinase Regulada por Sinal Extracelular
FTC	Carcinoma Folicular da tireoide
GAPs	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP	Guanosina Difosfato
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factors</i>
GH	Hormônio do Crescimento
GT	Glândula Tireoide
GTP	Guanosina Trifosfato
HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HGF	Fator do Crescimento do Hepatócito
H-RAS	<i>Rat Sarcoma Viral Oncogene</i>
IEC	Instituto Evandro Chagas
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
K-RAS	<i>Rat Sarcoma Viral Oncogene</i>
MAPK	Proteína-cinase Ativada por Mitógeno
MDM-2	<i>Murine Double Minute</i>
MTC	Carcinoma Medular da Tireoide

PAAF	Punção Aspirativa com Agulha Fina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTC	Carcinoma Papilífero da Tireoide
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tiroxina
TA	Temperatura de Anelamento
TGFB	Fator de Crescimento Transformante Beta
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide
TTF1	Fator de Transcrição da Tireoide 1
TTF2	Fator de Transcrição da Tireoide 2
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURAS

Figura 01	Características anatômicas da glândula tireoide.-----	13
Figura 02	Características histológicas do folículo tireoidiano.-----	14
Figura 03	Representação esquemática da via de sinalização MAPK.-	19
Figura 04	Família de genes RAS e suas proteínas.-----	20
Figura 05	Atuação das proteínas RAS de forma fisiológica e alterada.-----	21
Figura 06	Alterações genéticas no gene <i>H-RAS</i> .-----	22
Figura 07	Alterações genéticas no gene <i>K-RAS</i> .-----	23
Figura 08	Alterações genéticas no gene <i>N-RAS</i> .-----	24
Figura 09	Diagrama de mutações encontradas no gene <i>BRAF</i> .-----	25
Figura 10	Achados clinicopatológicos dos pacientes com PTC.-----	37
Figura 11	Perfil bioquímico dos pacientes com PTC.-----	38
Figura 12	Eletroferograma do <i>éxon</i> 15 do gene <i>BRAF</i> .-----	39
Figura 13	Eletroferograma do <i>éxon</i> 3 do gene <i>KRAS</i> .-----	40

QUADRO

Quadro 01	Classificação dos tumores da tireoide de acordo com tipo histológico, grau de diferenciação e comportamento biológico.-----	15
Quadro 02	Frequência da mutação no <i>BRAF</i> ^{V600E} em estudos com PTC.-----	26
Quadro 03	Mutações raras encontradas no <i>BRAF</i> .-----	27
Quadro 04	Sequência de <i>primers</i> usados para amplificação dos fragmentos de interesse dos genes <i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> e <i>NRAS</i> .-----	33
Quadro 05	Sequência de <i>primers</i> usados para amplificação dos fragmentos de interesse dos genes <i>BRAF</i> .-----	33
Quadro 06	Condições de amplificações dos fragmentos de interesse.-	34

RESUMO

O tipo mais comum de câncer de tireoide é o Carcinoma Papilífero (PTC), que representa 80% de todos os casos de neoplasias que acometem essa glândula. O PTC é um tumor maligno, de evolução lenta, que ocorre em qualquer idade, com maior frequência entre 30 a 40 anos. A via metabólica MAPK é a via mais associada ao PTC. Dentre as muitas proteínas que atuam nessa via e que se encontram alteradas nos casos de PTC, destacam-se aquelas codificadas por genes pertencentes às famílias *RAS* e *BRAF*. Considerando que na Amazônia brasileira, os estudos genéticos e clínicos sobre o câncer de tireoide são raros, o presente trabalho teve como objetivo investigar possíveis alterações nos genes *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *BRAF* em pacientes portadores de PTC oriundos de um hospital público da cidade de Belém (PA), e fazer a associação entre a mutação encontrada e os achados bioquímicos e clínicos. Para isso, foram utilizadas como ferramentas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a técnica de sequenciamento automático direto. A análise estatística foi realizada pelo pacote de *software SPSS versão 21.0*. Os dados contínuos foram expressos em média e desvio padrão e os dados categóricos foram expressos em porcentagem. O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar as variáveis contínuas e os testes exato de Fisher e Qui-quadrado foram usados para analisar as variáveis categóricas. Foi considerado $p < 0,05$ como significativo em todas as análises. Como resultados, a análise por sequenciamento do gene *BRAF* revelou a presença da mutação *BRAF^{V600E}* em 21 de 53 pacientes (16 mulheres e 5 homens, 39,6%), assim como uma mutação nova no códon 38 no gene *K-RAS* (p.D38E). Em relação aos dados clínicos, houve uma associação significativa entre a mutação *BRAF^{V600E}* e rouquidão, assim como entre a mutação *BRAF^{V600E}* e metástase linfonodal. Adicionalmente, a observação de uma nova mutação no gene *K-RAS* indica que o número de alterações gênicas envolvendo a via metabólica MAPK encontra-se ainda incompleto. Os dados obtidos podem ser utilizados para uma melhor avaliação pré-cirúrgica de tumores tireoidianos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade para a detecção do câncer e evitar cirurgias desnecessárias de lesões erroneamente identificadas como malignas.

Palavras Chave: Carcinomas Papilíferos da Tireoide; genes *H-RAS*, *N-RAS*, *KRAS*, *BRAF*; mutações.

ABSTRACT

The most common cancer of the thyroid is the papillary carcinoma (PTC), which represents 80% of the cases of cancer affecting this gland. PTC is a malignant tumor, with slow evolution, found in any age, but with a higher occurrence in patients between 30-40 years old. The metabolic pathway MAPK is the most associated with PTC. Among the several proteins which have a role in this pathway, we highlight the ones encoded by the genes belonging to families *RAS* and *BRAF*. Considering that there are few clinical and genetic studies focusing on thyroid cancer from Brazilian Amazonian region, the aim of this study was to investigate the occurrence of alterations in genes *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* and *BRAF* in patients with PTC treated in a public hospitals, from Belém (PA), seeking to make an association between the mutations found and the biochemical and clinical findings. To achieve this goal, polymerase chain reaction (PCR) and direct automatic sequencing were used. Statistical analyses were performed using the software SPSS version 21.0. Continuous data were expressed as means and standard deviation and categorical data were described in terms of percentages. Student t Test was used to evaluate the continuous variables, while Fisher exact test and Chi-square were used to analyze categorical variables. We considered $p < 0.05$ as significant value in all the analyses. Our results showed that, among the analyzed genes, only BRAF showed a mutation, *BRAF^{V600E}*, in 21 out of the 53 patients (16 female and 5 males, 39.6%). Additionally, a new mutation in codon 38 of gene K-RAS was found (p.D38E). Considering clinical data, we found a significant association between the *BRAF^{V600E}* mutation and hoarseness, as well as between this mutation and lymph node metastasis. In addition, the observation of a new mutation in the K-RAS gene indicates that the number of gene changes involving the MAPK pathway is still incomplete. The data obtained can be used for a better pre-surgical evaluation of thyroid tumors, in order to increase the sensitivity for the detection of cancer and avoid unnecessary surgeries of lesions erroneously identified as malignant.

Key words: thyroid is the papillary carcinoma, genes H-RAS, K-RAS, N-RAS and BRAF, mutations

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A GLÂNDULA TIREOIDE

A Glândula Tireoide (GT) é a primeira glândula endócrina a surgir durante o desenvolvimento embrionário, por volta da 4ª semana após a fecundação. Esta glândula é altamente vascularizada e desenvolve-se a partir de uma especialização endodérmica denominada de divertículo tireoidiano, o qual passa por transformações até originar a GT madura (Moore, 2013).

A GT está localizada na região do pescoço, inferiormente à laringe e anteriormente à traqueia, pesando, aproximadamente, 20 gramas no indivíduo adulto. A GT é constituída por dois grandes lobos, direito e esquerdo, os quais são unidos por uma delgada faixa de tecido denominado de istmo (Figura 01), do qual projeta-se, em alguns indivíduos, um terceiro lobo chamado piramidal, que consiste em um vestígio embrionário (Mohebbati & Shaha, 2012).

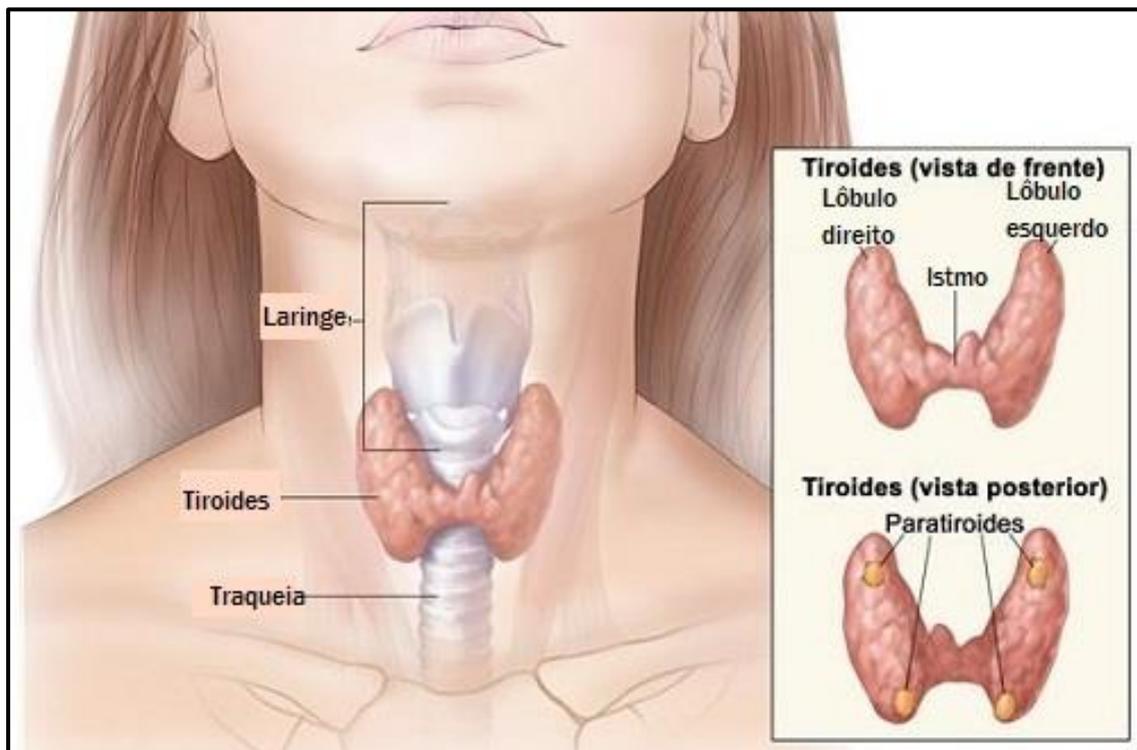


Figura 01. Características anatômicas da glândula tireoide. Fonte: <https://melhorcomsaude.com/wp-content/uploads/2014/03/Tiroides>.

A GT é constituída por unidades de formato esférico denominados de folículos tireoidianos (Figura 02), os quais são envolvidos por uma única camada de células foliculares, sendo ricamente vascularizados. O interior dos folículos apresenta uma massa coloidal onde são produzidos os hormônios tireoidianos (triiodotironina - T₃ e Tetraiodotironina – T₄), além da glicoproteína iodada denominada de tireoglobulina (Mohebaty e Shaha, 2012).

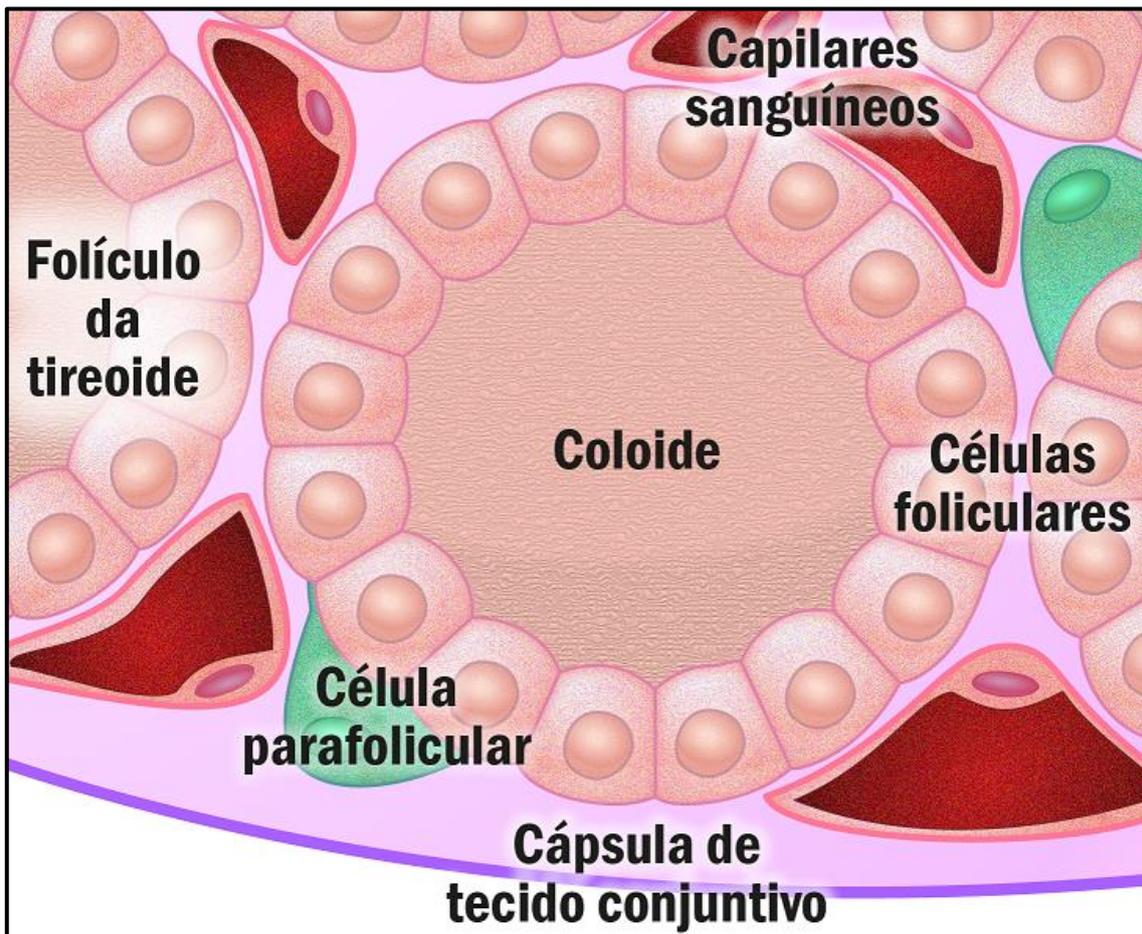


Figura 02. Características histológicas do folículo tireoidiano. Fonte: Adaptado de lab-siviero.icb.usp.br/biocel/modulos/secrecao-de-hormonios-tireoidianos.

Outro tipo de célula, a célula parafolicular ou célula C, é encontrado na GT fazendo parte do epitélio folicular, ou formando grupamentos isolados entre os folículos tireoidianos. A característica mais notável destas células é a presença de numerosos grânulos contendo um hormônio chamado calcitonina, cujo efeito principal é diminuir o nível de cálcio plasmático em função do estímulo da reabsorção de cálcio pelos ossos (Mohebaty & Shaha, 2012).

1.2. ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DA TIREOIDE

Os tumores malignos da GT constituem a forma mais comum de malignidade do sistema endócrino, afetando mais frequentemente as mulheres do que aos homens (De Souza *et al.*, 2010). Os tumores da tireoide são geralmente indolentes e apresentam comportamentos biológicos diferentes, que variam desde formas com baixo potencial letal até formas agressivas e de alta mortalidade (Golbert *et al.*, 2005).

O tumor originado das células C é classificado como Carcinoma Medular (MTC), enquanto que os tumores com origem nas células foliculares são classificados como Carcinoma Anaplásico (ATC), Adenoma Folicular (AFT), Carcinoma Folicular (FTC) e Carcinoma Papilífero (PTC) Quadro 01 (Golbert *et al.*, 2005).

Quadro 01. Classificação dos tumores da tireoide de acordo com tipo histológico, grau de diferenciação e comportamento biológico.

TIPO DE CÉLULA	TIPO DE TUMOR	GRAU DE DIFERENCIAÇÃO	COMPORTAMENTO BIOLÓGICO
CÉLULA FOLICULAR	Carcinoma Anaplásico	Indiferenciado	Maligno
	Carcinoma Folicular	Diferenciado	Maligno
	Carcinoma Papilífero	Diferenciado	Maligno
	Adenoma Folicular	Diferenciado	Benigno
CÉLULA C	Carcinoma Medular	Pouco-diferenciado	Maligno

Fonte: Adaptado de Matsuo *et al.*, 2004.

Os PTCs e FTCs são as neoplasias malignas da GT mais frequentes e, comumente, são reunidos em um grupo chamado de carcinomas diferenciados da tireoide, caracterizados por apresentarem células que se diferenciam ao ponto de manterem semelhança estrutural e funcional com o tecido tireoidiano normal, tais como a produção de T₄, tireoglobulina e de proteína transportadora de sódio e iodo (Monaco, 2003; Coelho *et al.*, 2007).

1.2.1. Carcinoma Papilífero da Tireoide

O Carcinoma Papilífero da Tireoide (PTC) é definido como um tumor epitelial maligno com diferenciação para células foliculares. É o tumor tireoidiano responsável por cerca de 80% dos casos de câncer de tireoide, sendo três vezes mais comum em mulheres que em homens. Esse tipo de tumor ocorre em qualquer idade, com maior frequência entre 30 a 40 anos (Davies *et al.*, 2002).

Clinicamente, o tumor apresenta-se como um nódulo tireoidiano palpável, nem sempre notado pelo próprio paciente, sendo geralmente diagnosticado por acaso ou em exames de rotina. Em cerca de 60% dos casos, o tumor é restrito à glândula, 38% apresentam metástases em linfonodos regionais e 1 a 2% mostram metástases à distância. O nódulo pode ter consistência firme ou cística, a glândula pode estar aumentada assimetricamente, difusamente, ou ser multinodular (Cambruzzi *et al.*, 2011).

Devido à grande variação histológica, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou o PTC em diversos tipos, dos quais os mais comuns são: tipo usual (50%), microcarcinoma (20% a 30%), variante folicular (10% a 20%), encapsulado (8% a 13%), de células altas (10%) e esclerosante difuso (3%) (Delellis *et al.*, 2004).

Existe um grande número de outras variantes, as quais são consideradas raras, a exemplo das variantes das células colunares. Estas variantes raras, quando agrupadas em sua totalidade, não ultrapassam 2% de todos os casos (Zidan *et al.*, 2003).

Baseados em critérios clínicos e patológicos, observou-se que a variante folicular do PTC é a de evolução mais grave, sendo encontrada frequentemente em adultos jovens. Esta variante apresenta características nucleares papilíferas em um padrão folicular, tendo sido encontrada em um percentual significativo de crianças e adolescentes de Chernobyl, após o acidente nuclear (Basolo *et al.*, 2002).

Assim como a variante folicular, a variante esclerosante difusa também é encontrada em crianças e jovens adultos, com metástases em linfonodos cervicais em quase todos os pacientes. Em contraste, as variantes de células altas e colunares são típicas de indivíduos idosos (Medeiros-Neto, 2003).

1.3. DIAGNÓSTICO DE TUMORES DA TIREOIDE

A avaliação clínica dos pacientes com suspeita de tumores tireoidianos é realizada pela palpação do pescoço, com o objetivo de identificar e caracterizar nódulos e possíveis gânglios linfáticos acometidos. A função da tireoide deve ser também verificada através de exames laboratoriais, tais como dosagem de tiroxina livre (T₄L), TSH e anticorpos antitireoidianos para diagnosticar eventual hipotireoidismo, hipertireoidismo ou tireoidite associada (Ferraz *et al.*, 2011).

A maioria dos pacientes com lesões tumorais na tireoide são assintomáticos. Os tumores são geralmente detectados após a identificação de um ou mais nódulos em exames de rotina ou em exames de imagens cervicais ou torácicas, realizados para diagnóstico ou tratamento de outras doenças (Vartanian, 2013).

O achado clínico mais frequente nos pacientes sintomáticos é a presença de um ou mais nódulos palpáveis na tireoide. Os tumores têm suspeitas de malignidade quando apresentam rápida expansão, textura firme, e sintomas de compressão de estruturas cervicais, tais como disfagia, disфонia, dispneia, rouquidão, além da presença de linfonodos ou massas fixas na região cervical (Vartanian, 2013).

O exame de ultrassonografia convencional ou com *Doppler* é muito empregado no diagnóstico dos tumores tireoidianos. Este exame permite avaliar aspectos como textura, tamanho, extensão e a ecogenicidade da glândula. Também possibilita determinar o tamanho, número, posição e características dos tumores, além da presença de malformações glandulares e alterações linfáticas. Apesar de analisar vários parâmetros, a ultrassonografia não consegue determinar se o tumor é benigno ou maligno (Kimura, 2011).

A Punção Aspirativa com Agulha Fina (PAAF), seguida da análise citológica é o melhor método para diferenciar lesões na tireoide (Deandrea *et al.*, 2002). Geralmente, a análise citológica classifica 60 a 70% dos tumores como benignos; 5 a 10% como malignos; 10 a 20% como indeterminados e 10 a 15% como inadequados. Os pacientes com exames classificados como inadequados, devem realizar uma nova PAAF; porém os tumores denominados indeterminados representam um dilema clínico, devido à dificuldade de classificá-los como benignos ou malignos (Cerutti, 2007).

1.4. BIOLOGIA MOLECULAR DOS TUMORES DA TIREOIDE

O controle do ciclo celular está sob o comando de dois grupos principais de genes: os proto-oncogenes, que são responsáveis pela codificação de fatores que estimulam a proliferação e a diferenciação celular; e os anti-oncogenes, também denominados de genes supressores de tumores, que desempenham o papel oposto (Cooper & Hausman, 2007).

Quando os proto-oncogenes sofrem alterações genéticas, eles passam a ser chamados de oncogenes, caracterizando-se pela perda do poder regulador da proliferação celular, levando a um crescimento desordenado das células e, conseqüentemente, formação de tumores. Já os genes supressores de tumores induzem a formação de tumores quando se encontram inativados ou perdidos. Isto se deve ao fato de, nestas situações, ocorrer a remoção de reguladores negativos da proliferação celular, os quais impedem a proliferação anormal de células tumorais (Rodrigues, 2003).

Para desencadear um evento que leve uma célula normal a se tornar cancerígena, é necessária uma mutação de ganho de função em apenas um alelo dos proto-oncogenes; enquanto que para os genes supressores de tumores são necessários dois eventos de mutação que inativem as duas cópias desses genes, ou seja, os dois alelos (Rodrigues, 2003).

Os tumores tireoidianos caracterizam-se por apresentar alterações genéticas que afetam, principalmente, a via de sinalização MAPK (Proteína Quinase Ativada por Mitógenos). Esta via intracelular, quando ativada em condições fisiológicas, é responsável por regular o crescimento, a diferenciação, a apoptose e a sobrevivência celular (Tang & Lee, 2010).

A via metabólica de sinalização MAPK é ativada em resposta a sinais mitogênicos externos, que interagem com os receptores tirosino-quinase presentes na superfície celular. Esses receptores ativam a proteína RAS (*Rat Sarcoma Viral Oncogene*) através da substituição da Guanosina Difosfato (GDP) pela Guanosina Trifosfato (GTP). A RAS ativa as proteínas RAF-cinases, recrutando-as para a membrana, figura 03 (Nikiforov, 2008).

A RAF-cinase do tipo B (também conhecida como BRAF), a mais abundante dessa família, é capaz de fosforilar e ativar a proteína MAPKK, que por sua vez fosforila e ativa a proteína ERK (ou MAPK) (Nikiforov, 2008).

Quando ativada, a ERK fosforila proteínas citoplasmáticas e é translocada para o núcleo, onde regula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Handkiewicz-Junak *et al.*, 2010).

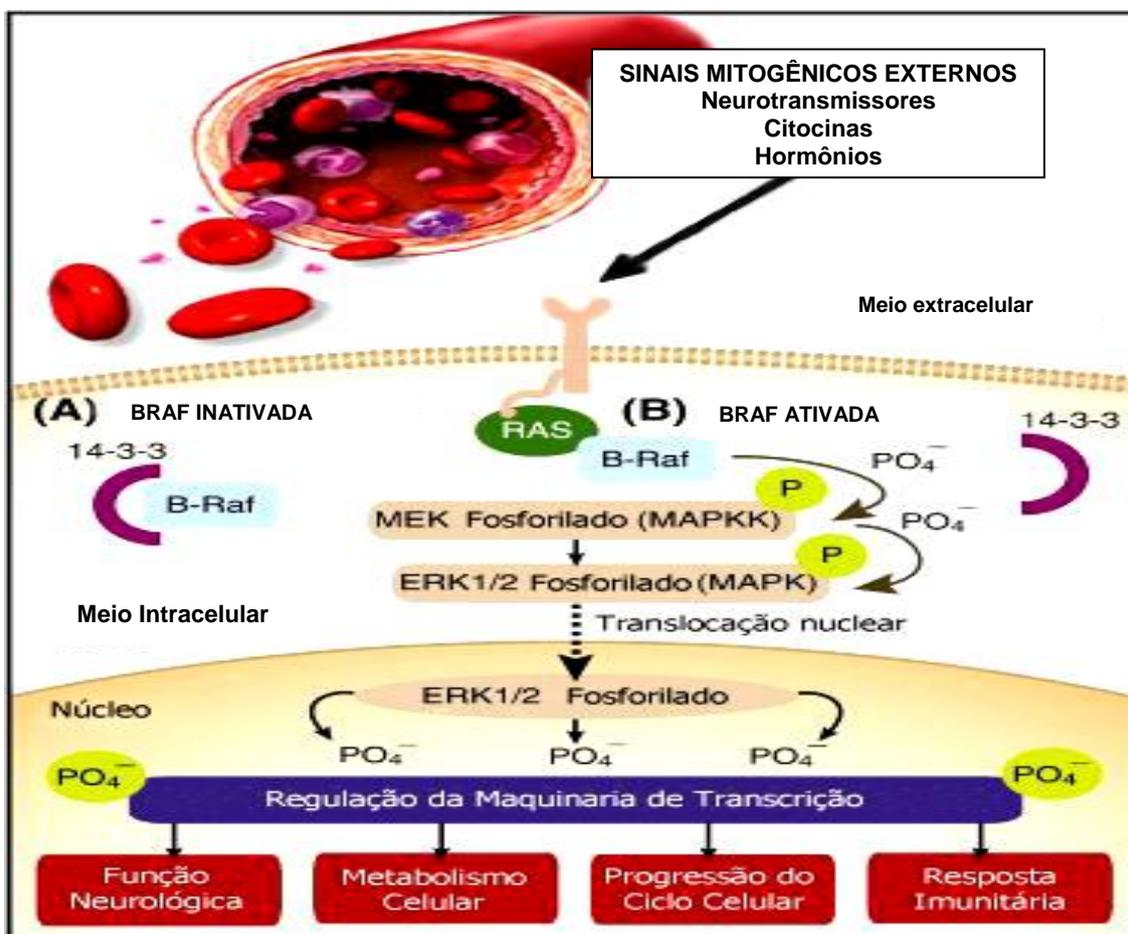


Figura 03. Representação esquemática da via de sinalização MAPK. O processo de sinalização começa com estimulação do receptor de tirosina cinase por sinais mitogênicos externos. Em seguida a proteína RAS é ativada ao se ligar com o GTP e interage com a BRAF, ativando-a. A BRAF por sua vez, realiza a fosforilação da MAPKK e MAPK. A consequência dessa cascata de reações é a ativação de genes envolvidos na proliferação celular, sobrevivência e possível carcinogênese. Fonte: Adaptada de Nucera, *et al.*, 2009; Lopes, 2011.

1.4.1. Família de Genes *RAS* e *BRAF*

As famílias dos genes *BRAF* e *RAS* são objeto de estudo de vários grupos de pesquisa no mundo. Isso se justifica pelo fato destes genes codificarem proteínas importantes em vias envolvidas no controle, crescimento, diferenciação e apoptose celular. Portanto, alterações nesses genes e, conseqüentemente, em suas proteínas, podem levar ao surgimento de vários tumores, incluindo os da tireoide (Oikonomou *et al.*, 2014).

1.4.1.1. Família de Genes *RAS*

Os proto-oncogenes *RAS* pertencem a uma pequena família de genes que abriga frequentemente mutações relacionadas à tumores humanos, constituindo as mutações mais prevalentes nas neoplasias em geral (20 a 30% de todos os tumores humanos têm mutações destes genes). Esta família de genes é constituída por três isoformas chamadas *H-RAS*, *N-RAS* e *K-RAS*, figura 04 (Bos, 1989; Demirag *et al.*, 2000).

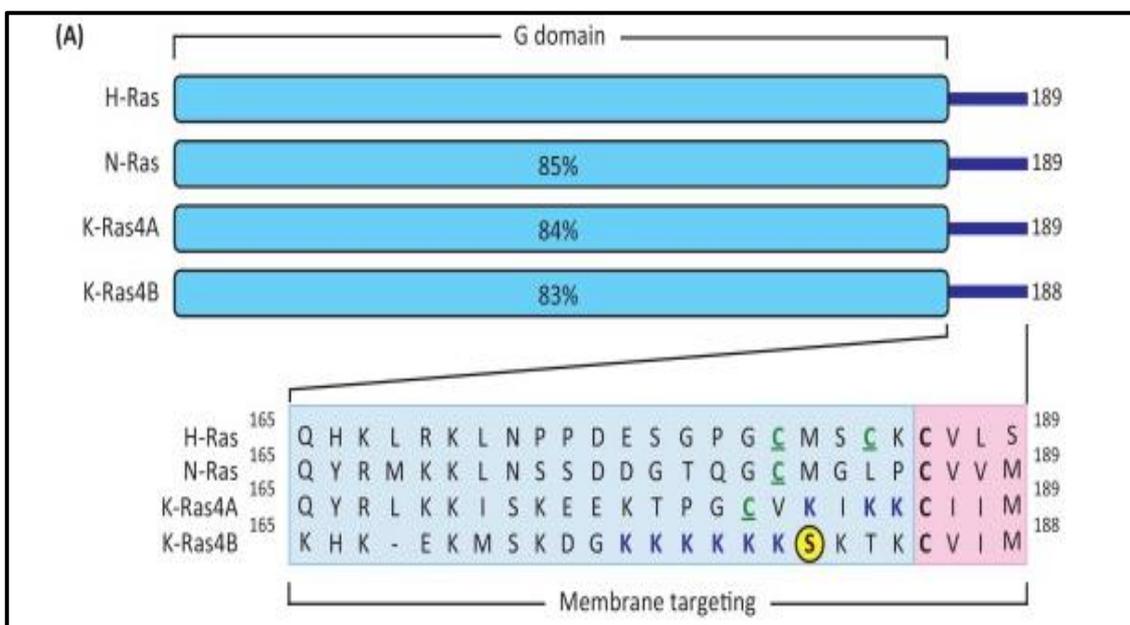


Figura 04. Família de genes *RAS* e suas proteínas. Os números em porcentagem indicam o grau de homologia tendo como referência o gene *H-RAS*. O gene *K-RAS* codifica duas proteínas (*K-RAS4A* ou *K-RAS4B*), devido à um *splicing* alternativo. Os aminoácidos 1 a 164 compreendem o domínio G que se liga e hidrolisa o GTP, enquanto que os 24 ou 25 aminoácidos C-terminais restantes compreendem a sequência de direcionamento para membrana. Os 20 ou 21 aminoácidos (sobreado em azul) compreendem a região hipervariável. Fonte: Adaptado de Bryant *et al.*, 2014.

Apesar do grau de homologia ser de aproximadamente 90%, as proteínas codificadas pela família de genes *RAS*, possuem em sua porção C-terminal, uma região denominada de domínio hipervariante, com índice de conservação de apenas 10 a 15% (Prior & Hancock, 2001). O domínio hipervariante é pouco caracterizado e acredita-se que seja altamente flexível, servindo para evidenciar diferenças estruturais e funcionais entre as proteínas *RAS* (Ellis & Clark, 2000).

As proteínas RAS estão associadas à superfície interna da membrana plasmática através de lipídeos, os quais são adicionados às proteínas por mudanças pós-traducionais (Reuter *et al.*, 2000). A atividade das proteínas RAS é regulada por duas classes de proteínas, denominadas GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*) e GAPs (*GTPase Activating Proteins*), (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

As proteínas GEFs induzem a ativação das RAS ao promoverem a sua dissociação do GDP e a ligação ao GTP; enquanto as proteínas GAPs agem inativando as RAS ao reconhecerem a proteína ativa, induzindo o aumento da velocidade de hidrólise do GTP, figura 05 (Kubrusly *et al.*, 2002; Malumbres & Barbacid, 2003).

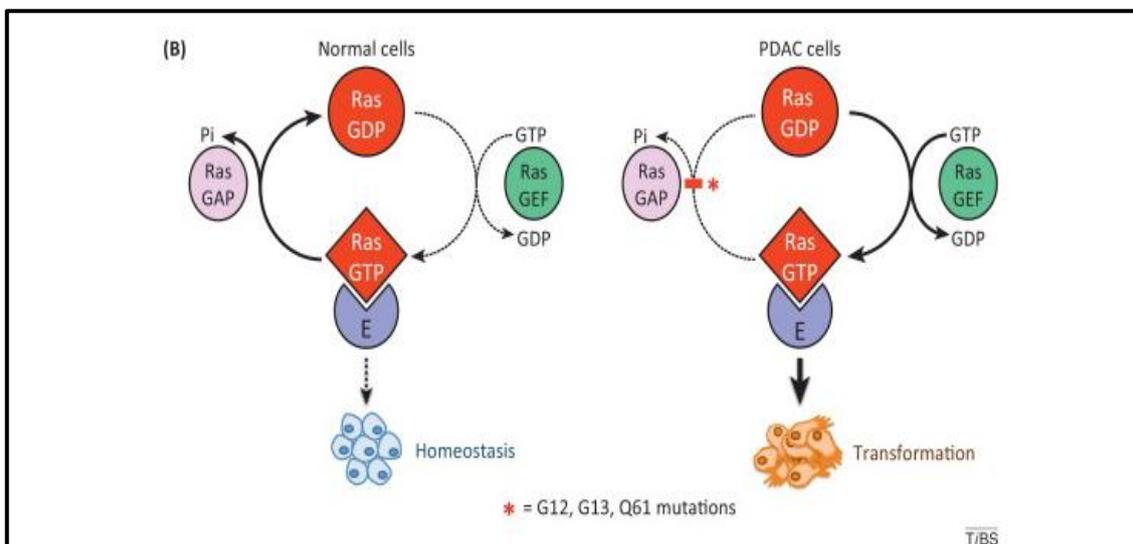


Figura 05. Atuação das proteínas RAS de forma fisiológica e alterada. Fonte: Adaptado de Bryant, *et al.*, 2014.

As mutações nos genes da família *RAS* acarretam a ativação constitutiva da via MAPK e a perda do controle do ciclo celular. Neste contexto, as proteínas RAS desempenham um papel fundamental na gênese e progressão de fenótipos malignos de neoplasias como de pulmão, pele, bexiga, mama, pâncreas, trato gastrointestinal, rim e múltiplas formas de leucemia, além de tumores da tireoide (Tyner *et al.*, 2009).

O gene *H-RAS* está situado no *locus* 11p15.5 e tem 4 éxons distribuídos por 3,3 Kb. Esse gene produz uma proteína chamada H-Ras que está envolvida principalmente na regulação da divisão celular. A proteína H-Ras é uma GTPase que atua na via de transdução de sinal estimulando as células a crescerem e dividirem-se. Quando comparada ao gene *K-RAS*, a frequência de mutações somáticas no gene *H-RAS* é considerada pequena, uma vez que, das 35.366 amostras de tumores testadas, apenas 1127 amostras apresentaram mutações neste gene, correspondendo uma frequência de aproximadamente 3,2% (Denayer *et al.*, 2008; Adrienne *et al.*, 2010).

A Figura 06, ilustra a localização do gene *H-RAS* e as mutações mais encontradas frequentes. À esquerda, a localização do gene no cromossomo 11 e, à direita, a distribuição das principais mutações. Aproximadamente, 97% das mutações neste gene estão restritas aos códons 12, 13 e 61, indicadas nas cores rosa e verde (Adrienne *et al.*, 2010).

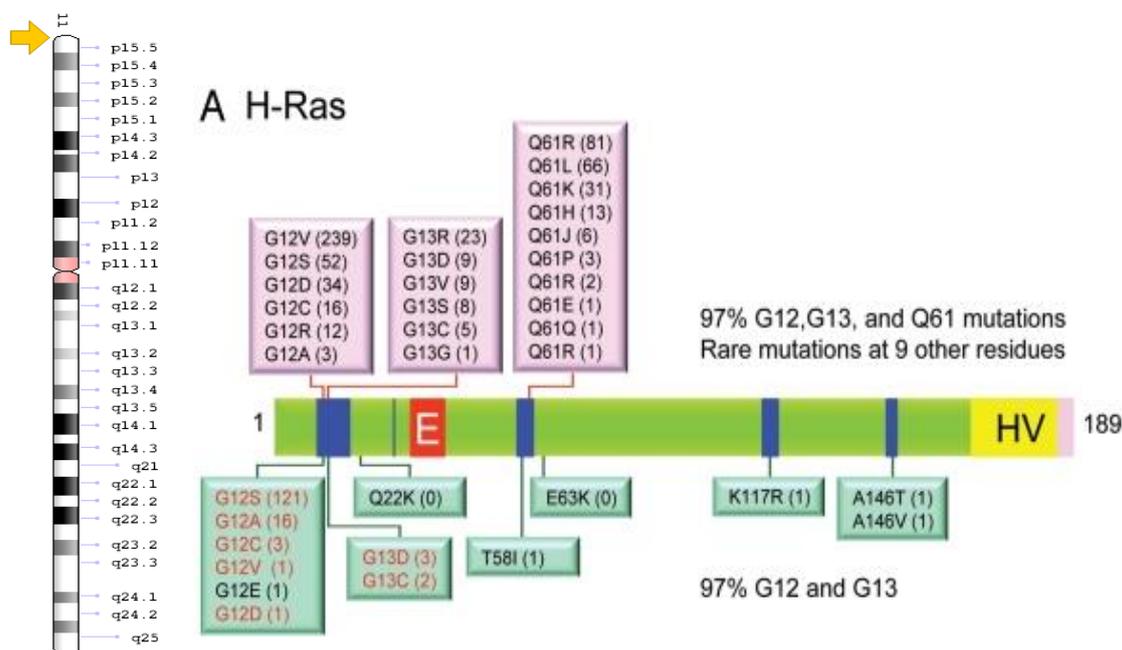


Figura 06. Alterações genéticas no gene *H-RAS*. Cada substituição específica nos códons 12, 13 e 61 estão indicadas na caixa rosa. A distribuição das principais mutações no esquema à direita. Note que, aproximadamente, 97% das mutações neste gene estão restritas aos códons 12, 13 e 61. Há também uma série de mutações consideradas raras. Fonte: Adrienne *et al.*, 2010

O gene *K-RAS* está no *locus* 12p12.1, apresenta um total de 6 éxons distribuídos em 0.3 Kb. Esse gene produz a proteína K-RAS, que está envolvida, principalmente, na via MAPK, que regula a divisão celular. Somente os éxons 2, 3 e 4 são codificantes, enquanto que o éxon 5 sofre o *splicing* alternativo. No mRNA KRAS, os éxons 1 e 6 são regiões não traduzidas (Carta *et al.*, 2006).

O gene *K-RAS* é a isoforma que apresenta maior número de mutações somáticas em cânceres humanos. As mutações neste gene são detectadas em 21,2% de todos os tumores humanos analisados (29 557 amostras mutadas de 139 474 amostras testadas), (Bertola *et al.*, 2007; Adrienne *et al.*, 2010).

A Figura 07 ilustra a localização do gene *K-RAS* e as mutações associadas a diversos tipos de tumores, incluindo os da tireoide.

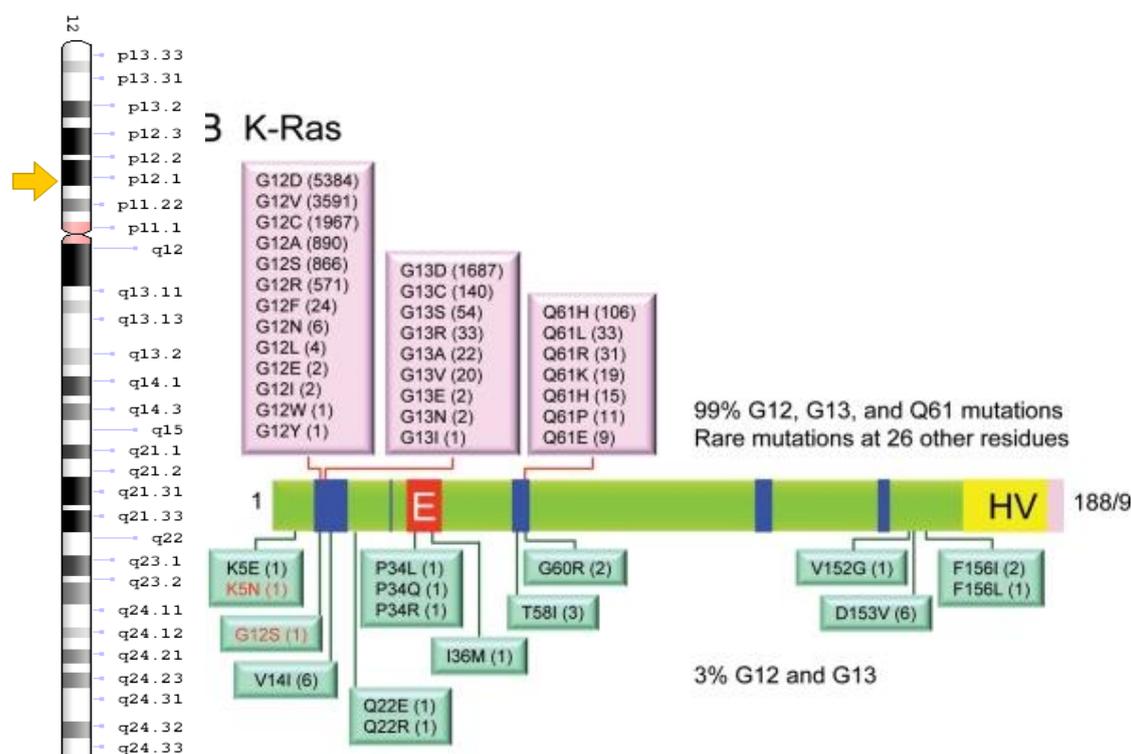


Figura 07. Alterações genéticas no gene *K-RAS*. A direita distribuição das principais mutações. Note que, aproximadamente, 99% das mutações neste gene estão restritas aos códons 12, 13 e 61. Fonte Adrienne *et al.*, 2010.

O gene *N-RAS* está situado no *locus* 1p13.2 e tem 7 éxons distribuídos por 12,4 Kb. Esse gene produz uma proteína chamada N-RAS que regula o ciclo celular através de sua ação GTPase estimulando a proliferação e desenvolvimento celular (Adrienne *et al.*, 2010).

A frequência de mutações somáticas gene *N-RAS* é maior que no gene *H-RAS*, porém é bem menor que no *K-RAS*. Do total de 62.609 amostras testadas em tumores, 3.587 apresentaram mutações no *N-RAS*, o que corresponde a um percentual de 5,7% (Oliveira *et al.*, 2007; Adrienne *et al.*, 2010).

A Figura 08 a seguir ilustra a localização do gene *N-RAS* e as mutações associadas ao câncer de tireoide.

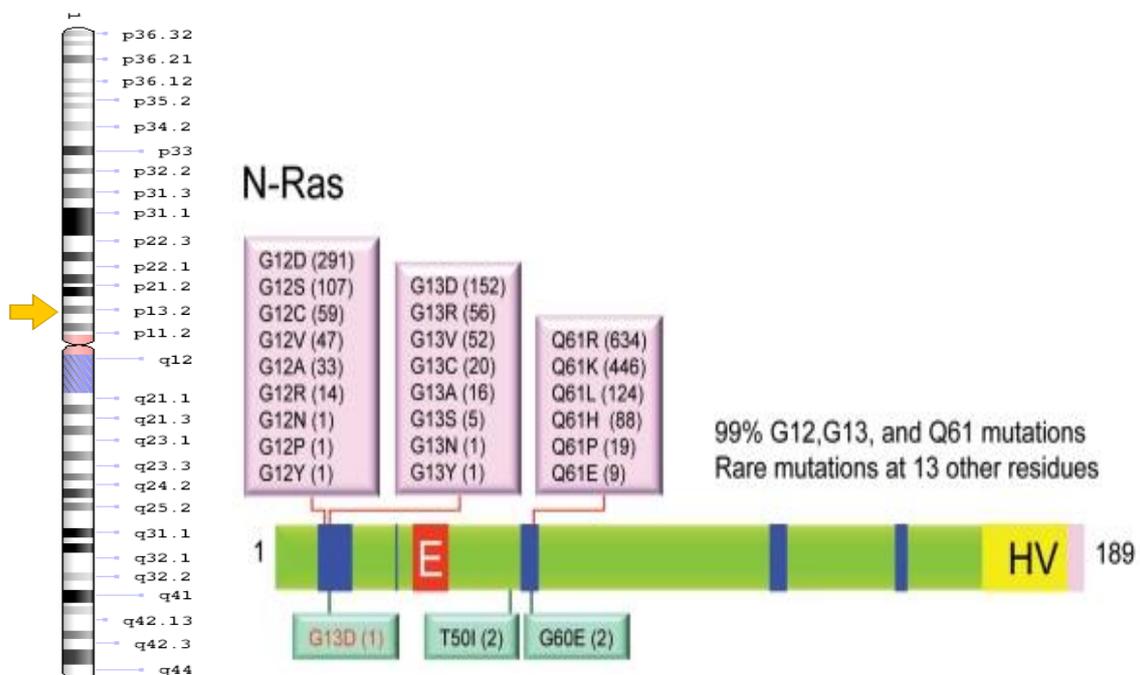


Figura 08. Alterações genéticas no gene *N-RAS*. À direita a as principais mutações encontradas no gene. Note que, aproximadamente, 99% das mutações neste gene estão restritas aos códons 12, 13 e 61. Fonte: Adrienne *et al.*, 2010

A ideia de que mutações na família dos genes *RAS* têm papel importante na tumorigênese da tireoide, vem sendo reforçada por estudos em células foliculares tireoidianas com mutações nestes genes. Nestas células foi observado que mutações nestes genes são responsáveis pela indução da proliferação e desdiferenciação celular (Matsuo *et al.*, 2004).

1.4.1.2. GENE *BRAF*

O proto-oncogene *BRAF* está situado no *locus* 7q34 e codifica uma proteína que pertence à família das serina-treonina-cinases. Este gene foi identificado por Davies *et al.* (2002) em diferentes tipos de câncer humano, especialmente nos melanomas e carcinomas do cólon. Posteriormente, Kimura *et al.* (2003) encontraram uma importante prevalência deste oncogene nos PTCs (36% dos 38 casos estudados), considerando-a como a mutação genética mais comum nestes tumores. Resultados semelhantes foram descritos por Cohen *et al.* (2003), que relatam mutação somática do *BRAF*, no éxon 15, em 69% dos PTC estudados.

O proto-oncogene *BRAF* possui 190.42 Kb distribuídos em 18 éxons (Figura 08). As regiões CR1, CR2 e CR3, são extremamente conservadas na família do gene RAF. A proteína codificada pelo gene *BRAF* é expressa em níveis elevados em células neuronais, hematopoiéticas, nos testículos e nas células foliculares da tireoide (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRAF>).

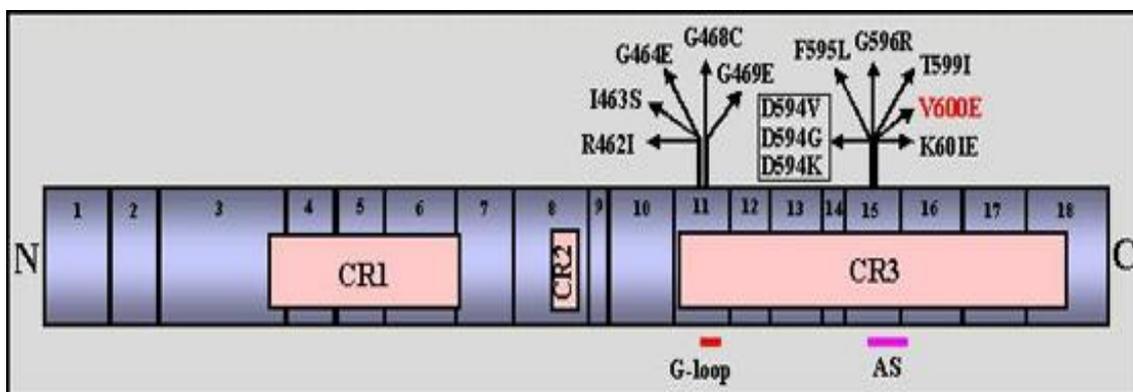


Figura 09. Diagrama de mutações encontradas no gene *BRAF* em pacientes com cânceres. As setas pretas indicam as mutações. As mutações dentro de uma caixa ocorrem no mesmo códon. A Alteração V600E, em vermelho, é a principal mutação encontrada em PTC. Os números de 1 a 18 indicam os éxons. A barra em vermelho indica o motivo em *loop* formado por glicina (*G-loop*) localizado no éxon 11. A barra em rosa (AS) indica o segmento de ativação da proteína que fica situada no éxon 15. A letra C corresponde a região carboxi-terminal, e letra N corresponde a região amino-terminal. Fonte: Adaptada de atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRAF.

Estudos *in vitro*, com modelos de células tireoidianas benignas, evidenciaram inicialmente um papel particularmente importante para o *BRAF*, como um regulador central da diferenciação e da capacidade proliferativa (Espinosa, 2007).

Demonstrou-se em modelos *in vitro* e *in vivo* que a hiper-expressão do *BRAF* induz transformação maligna e comportamento tumoral agressivo. Essas alterações estão provavelmente relacionadas com expressão aumentada de metaloproteínase 12 da matriz e de VEGF (Espinosa, 2007).

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos têm mostrado uma alta frequência de mutação no gene *BRAF* em pacientes com PTC. Estas alterações têm sido observadas em populações de diferentes áreas geográficas e origens étnicas, o que tem confirmado a papel do *BRAF* na patogênese do PTC (Xing, 2005).

As alterações no gene *BRAF* associados ao PTC são, quase exclusivamente, constituídas pela transversão de timina para adenina (T1799A) no éxon 15. Esta mutação *missense* causa a substituição do aminoácido valina pelo glutamato (V600E), levando ao surgimento do genótipo *BRAF*^{V600E} (Quadro 02) (Nucera *et al.*, 2009).

Quadro 02. Frequência da Mutação no *BRAF*^{V600E} em Estudos com PTC.

Total de Amostras Analisadas	Frequência da Mutação (%)	Autor de Estudo	Ano de Publicação
95	38	Cohen <i>et al</i>	2003
79	86	Kim <i>et al</i>	2005
96	42	Adeniran <i>et al</i>	2006
64	59	Takahashi <i>et al</i>	2007
40	55	Abrosimov <i>et al</i>	2007
91	45	Ugolini <i>et al</i>	2007
274	49	Kebelew	2007
25	48	Brzezianska <i>et al</i>	2007
11	45	Erickson <i>et al</i>	2007
108	50	Wang <i>et al</i>	2008
230	67	Park <i>et al</i>	2009
631	38	Ito <i>et al</i>	2009
242	33	Sykorova <i>et al</i>	2009
199	50	Yip <i>et al</i>	2009
1032	62	Guan <i>et al</i>	2009
49	41	Baitei <i>et al</i>	2009

A mutação *BRAF*^{V600E} produz a ativação constitutiva da proteína BRAF-cinase, já que resulta da inserção de um resíduo carregado negativamente adjacente a um local de fosforilação (Ser599), o que causa a ruptura de interações hidrofóbicas entre resíduos exatamente no local de ligação do ATP que mantinha a conformação inativa da proteína. Esta mutação, antes designada na literatura de V599E, foi corrigida em 1 códon em trabalhos mais atuais (Ciampi *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2005; Fusco *et al.*, 2005).

Recentemente, outras mutações têm sido descritas no gene *BRAF* (Quadro 03). Demonstrou-se que todas estas mutações descritas desestabilizam a conformação inativa do gene *BRAF*, induzindo uma ativação oncogênica constitutiva da enzima BRAF-cinase (Wan. *et al.*, 2004; Trovisco *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2007).

Quadro 03. Mutações raras encontradas no *BRAF*

<i>BRAF</i> ^{K601E}	<i>BRAF</i> ^{E26D}	<i>BRAF</i> ^{P334S}
<i>AKAP9BRAF</i>	<i>BRAF</i> ^{Q609Q}	<i>BRAF</i> ^{V480M}
<i>BRAF</i> ^{VK600-1E}	<i>BRAF</i> ^{G464R}	<i>BRAF</i> ^{S326P}
<i>BRAF</i> ^{V599ins}	<i>BRAF</i> ^{N581I}	<i>BRAF</i> ^{L678I}
<i>BRAF</i> ^{V600E+K601del}	<i>BRAF</i> ^{L618W}	<i>BRAF</i> ^{E648G}
<i>BRAF</i> ^{V600D+FGLAT601-605ins}	<i>BRAD</i> ^{A762V}	<i>BRAF</i> ^{R271H}
<i>BRAF</i> ^{V600K}	<i>BRAF</i> ^{R443T}	<i>BRAF</i> ^{E611D}
<i>BRAF</i> ^{V600R}	<i>BRAF</i> ^{G615R}	<i>BRAF</i> ^{H574N}
<i>BRAF</i> ^{D594G}	<i>BRAF</i> ^{S615R}	<i>BRAF</i> ^{A184T}
<i>BRAF</i> ^{F595S}	<i>BRAF</i> ^{K499N}	<i>BRAF</i> ^{G466R}

Fonte: Adaptado de cancer.sanger.ac.uk/cosmic.

Desde a descoberta inicial de mutações no gene *BRAF* nos tumores humanos, houve mais de 100 mutações identificadas nesse gene, das quais a mutação de ponto T1799A totaliza cerca de 90% de todas as mutações neste oncogene. Esta se apresenta como uma alteração genética somática, não surgindo em contexto de carcinoma familiar da tireoide, no qual as mutações são germinativas (Garnett *et al.*, 2004; XING *et al.*, 2007; Gradíssimo, 2008).

A importância do genótipo *BRAF*^{V600E} é revelada pelos diversos estudos publicados, os quais têm demonstrado, nos últimos anos, que a mutação T1799A encontra-se presente em um grande número de casos de PTC, com prevalência média de 49%. O genótipo *BRAF*^{V600E} possui elevada frequência na forma clássica e na variante de células altas do PTC, com prevalência média de 54% e 68%, respectivamente, sugerindo que esta mutação funciona como um evento específico e precoce para estes fenótipos de PTC, desempenhando um papel fundamental na iniciação da tumorigênese (Nikiforova *et al.*, 2003; Sedliarou *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Ugolini *et al.*, 2007).

Essa ideia é apoiada pela presença desta mutação nos microcarcinomas papilíferos da tireoide (20-52%). Em oposição aos PTC dos adultos, os tumores pediátricos (esporádicos ou aqueles induzidos pela radiação), têm baixa prevalência de mutações *BRAF* (0-12%) (Kumagai *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2004; Nikiforova *et al.*, 2004).

É importante acrescentar que, para além das mutações pontuais, o gene *BRAF* pode ser igualmente ativado por rearranjo intra-cromossômico, nomeadamente através de uma inversão paracêntrica do cromossomo 7q, com a consequente fusão com o gene *AKAP9*. A proteína de fusão resultante apresenta uma elevada atividade cinásica. Este rearranjo foi encontrado primariamente em tumores associados à história recente de exposição à radiação, nomeadamente em cerca de 11% dos PTC que se desenvolveram 5-6 anos após exposição à radiação ionizante (Ciampi *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Enquanto a incidência de muitos tipos de câncer de cabeça e pescoço tem demonstrado decréscimo, a incidência de câncer de tireoide tem evidenciado um aumento significativo (Davies & Welch, 2006). No ano de 2012 foram estimados cerca de 300 mil casos novos desse câncer no mundo (230 mil entre as mulheres e 70 mil entre os homens) com maiores incidências em mulheres de populações da América Central, Japão e Ilhas do Pacífico (Ferlay *et al.*, 2013).

Tambem em 2012, mundialmente o número estimado de óbitos por câncer de tireoide foi de 27.000 em mulheres e 13.000 em homens, correspondendo a taxas de mortalidade de aproximadamente 0.6/100.000 mulheres e 0.3/100.000 homens (La Vecchia *et al.*, 2015).

No Brasil, esperam-se para o ano de 2017, aproximadamente, 1.570 novos casos de câncer de tireoide para o sexo masculino e 8.040 para o sexo feminino, com um risco estimado de 1,49 casos a cada 100 mil homens e 7,47 casos a cada 100 mil mulheres. Na região norte do Brasil o câncer de tireoide é o quinto mais frequente entre as mulheres (INCA, 2017).

Na região Amazônia, os estudos sobre alterações genéticas, moleculares e características clinicopatológicas no câncer da tireoide, são raros. Neste sentido nossa pesquisa tem como finalidade contribuir para melhor compreensão das alterações genéticas nos genes *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* E *BRAF*, em pacientes com carcinoma papilífero da tireoide, que é o câncer que representa mais de 80% dos cânceres da tireoide.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de mutações nos genes *H-RAS*, *N-RAS*, *K-RAS* e *BRAF* em carcinoma papilífero da tireoide em amostras obtidas da população paraense.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características demográficas dos 53 pacientes constituinte da nossa amostra.
- Relatar os achados clinicopatológicos nas frequentes dos pacientes com PTC, em nossa amostra, além de outros descritos na literatura.
- Relatar os níveis séricos do TSH e T4L nos pacientes com PTC, antes e depois da realização da tireoidectomia total.
- Descreve as alterações gênicas encontradas nos genes *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *BRAF* e comparar com as descritas na literatura.
- Associar as alterações nucleotídicas no gene *BRAF* com diferentes achados clinicopatológicos dos pacientes com PTC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

A população de estudo foi constituída por pacientes que foram submetidos à cirurgia para remoção da tireoide no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) localizado em Belém do Pará. Os pacientes e/ou seus responsáveis foram informados sobre o estudo a ser realizado, através de palestra de esclarecimento.

Os pacientes que concordaram em participar do estudo foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme rege a resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, sobre aspectos éticos envolvendo a pesquisa em seres humanos, autorizando suas participações e possibilitando a coleta de material biológico para pesquisa.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HUJBB (protocolo: 3350/09).

4.2. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Um total de 53 amostras de PTC foram analisadas. As amostras foram coletadas a partir de tecido parafinado e transportadas para o Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) da Universidade Federal do Pará (UFPA), localizado em Belém.

No LEIM, as amostras foram identificadas com nome, sexo do paciente e data da coleta. Em seguida as amostras foram armazenadas no freezer -80°C, para posterior utilização.

4.3. INFORMAÇÕES CLINICOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES

As informações clinicopatológicas foram coletadas nos prontuários dos pacientes pelo cirurgião de cabeça e pescoço colaborador da pesquisa. Em nosso estudo foram coletados os seguintes dados: sexo, TSH, T4L, disfagia, dispnéia, rouquidão e metástase linfonodal. Os dados coletados foram inseridos no *software SPSS versão 21* (IBM corp., New York, USA) e posteriormente analisados.

4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

O critério utilizado para a inclusão dos pacientes neste trabalho foi o diagnóstico confirmado de PTC, obtido através da avaliação clínica e associada ao exame citopatológico. Os critérios de exclusão utilizados foram a presença de outro tipo de câncer da tireoide ou diagnóstico negativo para câncer.

4.5. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Para obtenção de DNA genômico, foi, previamente, realizada a etapa de desparafinização do tecido tumoral. Em seguida as amostras tiveram seu DNA genômico extraído, utilizando o *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, CA, USA). Cada amostra foi diluída com tampão TE e quantificada foi estimada através do *Nanodrop ND-2000 Spectrophotometer* (CA, USA), versão 1.4.1, utilizando o *software* associado.

4.6. AMPLIFICAÇÕES DOS FRAGMENTOS DOS GENES DE INTERESSE

Na pesquisa foram investigadas alterações nos seguintes fragmentos: éxons 1 e 2 dos genes *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, e éxons 11 e 15 do gene *BRAF*, uma vez que, esses fragmentos concentram a maioria das mutações. Os *primers* de cada fragmento foram obtidos na literatura e estão descritos nos Quadros 04 e 05.

Quadro 04. Sequência de *primers* usados para amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, em padronizadas temperaturas de anelamento (TA).

GENE	FRAG.	SEQUÊNCIA DO PRIMER	TAMANHO DO ÉXON	TA (°C)
<i>KRAS</i>	1	F - 5'-TTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAA-3' R - 5'-TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'	111	54
	2	F - 5'-TTTTTGAAGTAAAAGGTGCACTG-3' R - 5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3'	179	58
<i>HRAS</i>	1	F - 5'-GGCAGGAGACCCTGTAGGAG-3' R - 5'-AGCCCTATCCTGGCTGTG-3'	111	62
	2	F - 5'-GTCCTCCTGCAGGATTCCTA-3' R - 5'-ATGGCAAACACACACAGGAA-3'	179	60
<i>NRAS</i>	1	F - 5'-CACTAGGGTTTTTCATTTCCATTG-3' R - 5'-TCCTTTAATACAGAATATGGGTAAAGA-3'	111	62
	2	F - 5'-TTGCATTCCCTGTGGTTTTT-3' R - 5'-CCATAATAAAAAGCTCTATCTTCCC-3'	179	58

Fonte: Sadow *et al.*,2010).

Quadro 05. Sequência de *primers* usados para amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *BRAF*, em padronizadas temperaturas de anelamento (TA).

GENE	EXON	SEQUÊNCIA DO PRIMER	TAMANHO DO ÉXON	TA (°C)
<i>BRAF</i>	11	F - 5'-TCTGTTTGGCTTGACTTGACTT-3' R - 5'-CGAACAGTGAATATTTCCTTTGAT-3'	118	58
	15	F - 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3' R - 5'-AGCATCTCAGGGCCAAAAT-3'	119	57

Fonte: Sadow *et al.*,2010.

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram padronizadas realizando-se uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos, repetindo as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 1 minuto, com temperatura de anelamento dos *primers* (TA) variável, e a extensão à 72°C por 1 minuto.

Após o término dos ciclos foi feita uma extensão final à 72°C por 5 minutos. Finalmente foram utilizados 4 µl de cada produto da PCR para realização da eletroforese em gel de agarose 2%, com o objetivo de verificar a qualidade da reação.

As condições de amplificação dos segmentos dos genes estão resumidas no Quadro 06.

Quadro 06 – Condições de amplificações dos fragmentos de interesse

Estágios		Número de Ciclo	Temperatura	Tempo (minuto)
1º	Desnaturação inicial	1	94 °C	5
2º	Desnaturação	35	94°C	1
	Anelamento		De acordo com o segmento	1
	Extensão		72 °C	1
3º	Extensão final	1	72 °C	5

4.7. IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS SEGMENTOS ESTUDADOS

Neste trabalho foi utilizada a técnica de sequenciamento automático direto com uso do *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1* que utiliza a enzima *AmpliTaQ® DNA (Applied Biosystems, CA, USA)*. Os *primers* utilizados foram os mesmos usados na PCR e as amostras sequenciadas foram submetidas à eletroforese no *ABI 3130 Genetic Analyzer, (Applied Biosystems, CA, USA)* que usa o Pop 7 como polímero para migração dos fragmentos (*Applied Biosystems, CA, USA*). As sequências geradas foram analisadas com o auxílio dos programas *BioEdit (7.2.5)* e *Chromas Lite (2.1.1)*.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando-se o *software* SPSS versão 21.0 (IBM corp., New York, USA). Os dados contínuos foram expressos em média e desvio padrão e os dados categóricos foram expressos em porcentagem. O teste t de *Student* foi utilizado para avaliar as variáveis contínuas e os testes exato de Fisher e Qui-quadrado foram usados para analisar as variáveis categóricas. Foi considerado $p < 0,05$ como significativo em todas as análises.

As frequências das mutações encontradas foram calculadas pela divisão do número de alelos portadores das mesmas pelo número total de alelos pesquisados. Para a determinação dos valores percentuais este coeficiente foi multiplicado por 100.

5. RESULTADOS

5.1. Descrição das características demográficas

Do total de 53 pacientes analisados com PTC, 12 (22,6%) do sexo masculino e 41 (77,4%) do sexo feminino. A idade média dos pacientes no momento de diagnóstico foi de $40,2 \pm 11,1$ anos e o tamanho médio do tumor foi de $1,1 \pm 0,80$ cm, com tamanho variando entre 0,6 e 4,5 cm. Os microcarcinomas papilíferos da tireoide (<1 cm) foram observados em 36 casos (68%) enquanto que 17 pacientes (32%) possuíam tumores ≥ 1 cm. A análise dos linfonodos revelou que 39,6% dos pacientes apresentavam metástase linfonodal. Quarenta e quatro pacientes (83%) apresentaram tumor unilateral e 9 (17%) pacientes possuíam tumores bilaterais. Em relação a idade dos pacientes no momento do diagnóstico, 66% tinham menos de 45 anos de idade e 18 (34%) tinham ≥ 45 anos de idade. As características demográficas estão resumidas na tabela 01.

Tabela 01. Características demográficas dos pacientes com PTC

Características	Valor (%)
N	53 (100,0)
Gênero	
Masculino	12 (22,6)
Feminino	41 (77,4)
Idade de diagnóstico	
<45	18 (34,0)
>45	35 (66,0)
Tamanho do tumor	
1cm	36 (68,0)
≥ 1 cm	17 (32,0)
Bilateralidade	
Unilateral	44 (83,0)
Multilateral	09 (17,0)
Metástase linfonodal	
Ausente	32 (60,4)
Presente	21 (39,6)

5.2. Achados clinicopatológicos mais frequentes dos pacientes com PTC em nossa amostra.

Os pacientes com PTC podem apresentar características clinicopatológicas inespecíficas que não ajudam ao tem pouca importância para o diagnóstico do tumor. Porém há também manifestações de características que tem importância, contribuindo para direcionar para a suspeito de PTC. Em nosso trabalho investigamos características com importância, do ponto de vista da contribuição no auxílio diagnóstico do PTC. Nos resultados revelaram que o principal achado foi a dispneia (57%), seguida da rouquidão (47%) disfagia e metástase linfonodal, os quais possuíram o mesmo percentual (40%) (Figura 10).

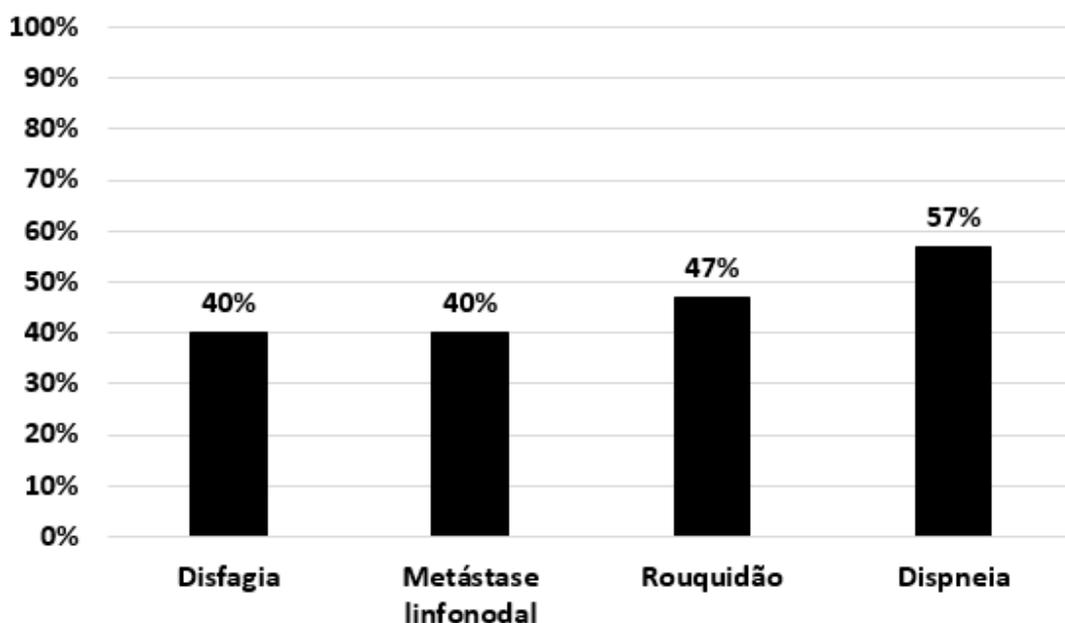


Figura 10. Achados clinicopatológicos dos pacientes com PTC

5.3. Níveis de TSH e T4L nos pacientes com PTC, antes e depois da realização da tireoidectomia total.

Os resultados da análise bioquímica revelaram que a média dos valores de TSH pré-operatório estavam dentro dos valores de referência (0,4 a 4,5 mUI/L), no entanto, a média do TSH pós-operatório estava elevada (Boucal *et al*, 2011).

Em relação a T₄L, nossa pesquisa mostrou que os valores médios pré-operatórios estavam elevados, enquanto que os pós-operatórios tiveram uma redução significativa, porém ficaram, dentro do intervalo de referência (0,7 a 2,5 ng/dL) (Figura 11).

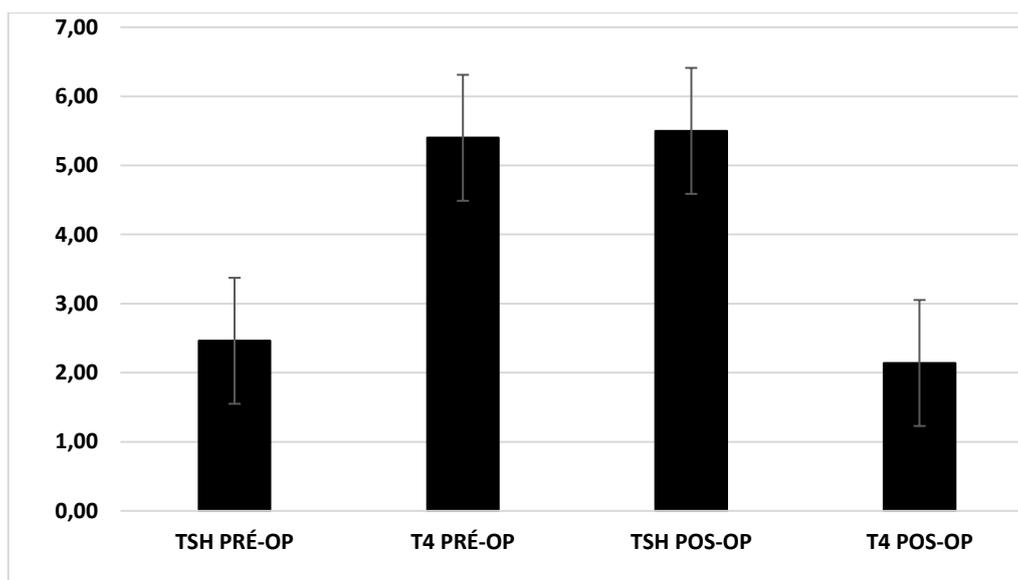
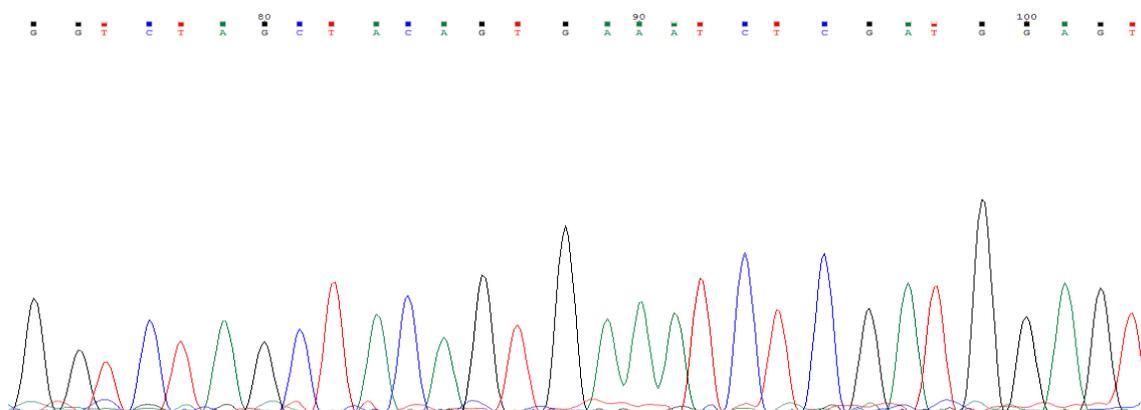


Figura 11. Perfil bioquímico dos pacientes com PTC. Legenda: PRÉ-OP: Pré-operatório; PÓS-OP: Pós-operatório

5.4. Mutações nos genes *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *BRAF*

Com base na análise do sequenciamento automático direto de DNA do gene *BRAF* foi encontrada a mutação *missense V600E* em 21 pacientes com PTC (39,6%). Todos os 21 pacientes, constituídos por 5 homens e 16 mulheres, apresentaram a *status BRAF^{V600E}* em heterozigose (Figura 12). A mutação *V600E* altera o resíduo de valina por um resíduo de ácido glutâmico e está localizada no éxon 15 do gene na posição 1799, resultante da transversão de timina pela adenina (T>A).

A)



B)

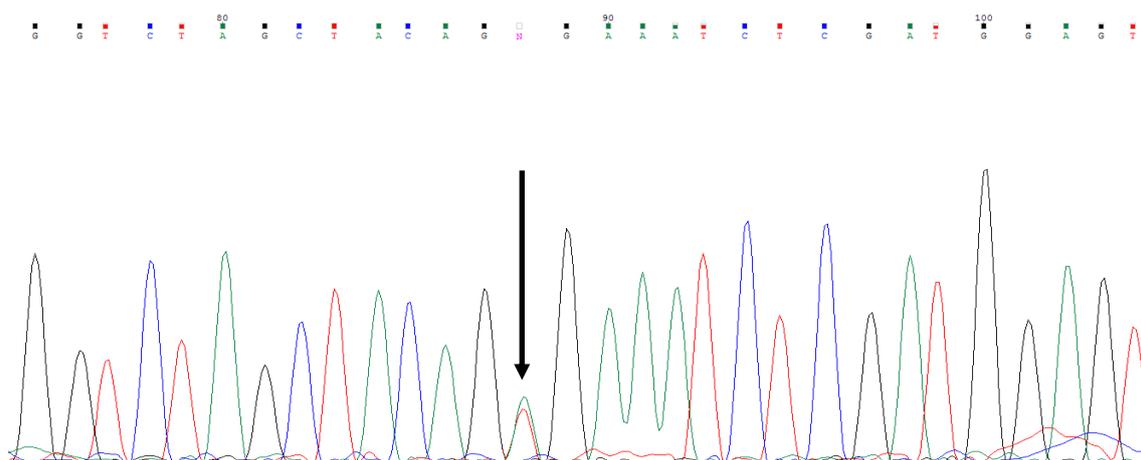


Figura 12. Eletroferograma do éxon 15 do gene *BRAF*, de amplicons de duas amostras de PTC. A: indica a sequência selvagem, caracterizada pela ausência de mutação. B: indica a sequência com mutação em heterozigose (seta) caracterizada pela presença de dois picos nucleotídicos na posição 1799, resultante da transversão de timina pela adenina (T>A).

Também foi encontrada uma mutação ainda não descrita na literatura, na sequência do gene *KRAS*. Trata-se de uma mutação resultante de uma transversão de timina para adenina (T>A) no códon 38. Esta mutação altera o resíduo do aminoácido aspartato para o resíduo de glutamato (p.D38E) (Figura 13). A nova variante não estava presente nos bancos de dados verificados - *Human Gene Mutation Database (HGMD)*, *dbSNP Database*, *1000 Genomes Project Database*, nem no *Exome Variant Server Database*.

O paciente portador dessa mutação nova era do sexo feminino tinha 32 anos de idade no momento do diagnóstico, e exibia as seguintes características clinicopatológicas: tumor de 3,90 cm, metástase linfonodal, tosse, rouquidão, disfagia e dispnoia.

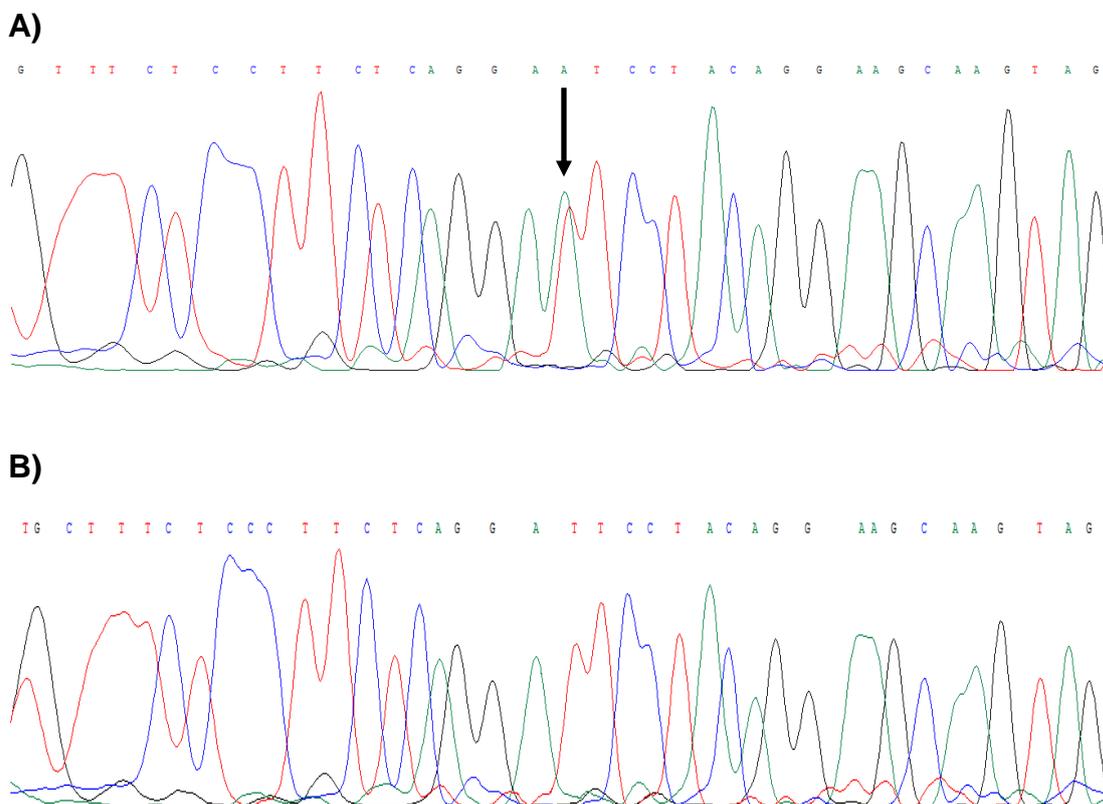


Figura 13. Eletroferograma do éxon 3 do gene *K-RAS*, de amplicons de duas amostras de PTC. A: indica a sequência alterada caracterizada pela presença da mutação em heterozigose (seta) indicada por dois picos nucleotídicos, resultantes da transversão de T>A no códon 38 que altera o resíduo de aspartato para um de glutamato. B: indica a sequência selvagem caracterizada pela ausência da mutação.

Em relação aos genes *HRAS* e *NRAS*, apesar da análise criteriosa dos principais fragmentos selecionados em nosso estudo, o sequenciamento automático direto não revelou alteração.

5.5. Associação das Características clinicopatológicas com a mutação *BRAF^{V600E}*

Na Tabela 1 estão os resultados da mutação *BRAF^{V600E}* e características clinicopatológicas dos pacientes com PTC. Houve uma associação significativa entre a mutação *BRAF^{V600E}* e rouquidão, assim como entre a mutação *BRAF^{V600E}* e metástase linfonodal, enquanto nenhuma correlação significativa foi encontrada com disfagia e dispneia.

Tabela 02. Associação entre a mutação *BRAF^{V600E}* e as características clinicopatológicas de pacientes com câncer papilífero da tireóide.

Características	<i>BRAF^{V600E}</i>	BRAF – tipo selvagem	P*
Clinicopatológicos	n = 21	n = 32	
Sexo	Masculino 5 Feminino 16	Masculino 7 Feminino 25	0.5624
Disfagia	11 (52.4%)	10 (31.25%)	0.2108
Dispneia	14 (66.7%)	16 (50%)	0.3607
Rouquidão	18 (85.7%)	7 (21.9%)	0.0001
Metástase linfonodal	13 (61.9%)	8 (37.5%)	0.0164

*p-valor < 0,05.

6. DISCUSSÃO

6.1. Características demográficas

Quanto aos aspectos demográficos, muitos trabalhos tem avaliado características como sexo do paciente, idade no momento do diagnóstico, tamanho do tumor e metástase linfonodal, uma vez que estas informações podem estar associada a malignidade e ao surgimento precoce da neoplasia.

Estudo conduzido por Hwang *et al*, 2010, analisou 135 pacientes com PTC. Deste total, 81,5% dos pacientes eram do sexo feminino e 28,5% do sexo masculino. A idade média dos pacientes foi $47 \pm 9,2$ anos (intervalo 26 a 73 anos), o tamanho médio do tumor era de $1,0 \pm$ cm (intervalo 0,3 a 4,0 cm) e 56% apresentavam microcarcinoma papilífero da tireoide (<1 cm) enquanto que 44% dos pacientes tinham tumores ≥ 1 cm.

Tagada *et al*, (2011) realizaram um estudo retrospectivo no Japão, com 152 pacientes com PTC. Do total de pacientes, 85,8% era do sexo feminino e 14,2% do masculino, a idade foi de $44,5 \pm 12,7$ (intervalo 9 a 69), o tamanho médio do tumor foi de $2,51 \pm 1,25$ cm (0,4–7).

Em nosso estudo observamos tamanho médio do tumor de $1,1 \pm 0,80$, semelhante ao encontrado por Hwang *et al* 2010. Os achados sobre o tamanho de tumores em indivíduos com PTC exibem uma grande diferença. Isso pode, ao menos parcialmente, ser explicado pelas diferenças no perfil étnico, ancestral e tipo de mutação encontrada nos tumores.

Pesquisa bem conduzida realizada por Ahn *et al*, (2014) apontou que no momento do diagnóstico, 68% dos pacientes possuíam idade ≥ 45 anos enquanto que, 32% tinham idade <45 anos. Em relação nossa pesquisa observamos percentuais semelhantes, visto que 66% dos nossos pacientes com PTC tinham <45 anos e 34% apresentavam idade ≥ 45 anos.

A presença de metástase linfonodal é uma das características mais estudadas. Estudos tem relatado frequência variando entre 30 a 80%. Nossos resultados apontam uma frequência de 39,6%. Esta característica clínica é de relevância, visto que, representa a principal causa de recorrência de PTC, e estudos de bases populacional tem indicado uma maior taxa de mortalidade associada (Yang *et al*, 2016).

6.2. ACHADOS CLINICOPATOLÓGICOS

Os pacientes com PTC exibem um grupo de achados clinicopatológicos associados com o aparecimento e desenvolvimento do câncer. Na maioria dos pacientes com PTC, a apresentação clínica é caracterizada pelo surgimento de nódulo solitário e assintomático ou bócio multinodular detectado em exame físico de rotina, durante uma cirurgia por doença benigna da tireoide, incidentalmente em exames de imagens efetuados por outras razões, ou como nódulo palpável (situação atualmente menos comum).

Embora a maioria dos nódulos tireoidianos sejam solitários e assintomáticos, alguns podem apresentar outras características que alertam para uma maior probabilidade de tumores malignos, tais como história de crescimento tumoral rápido, nódulos fixos aos tecidos adjacentes, aparecimento de sintomas como disfonia, rouquidão, paralisia das cordas vocais e presença de metástases ganglionares ipsilaterais (Tuttle *et al.*, 2010).

Cerca de 1/3 dos doentes com PTC apresentam alguma outra doença tireoidiana subjacente, tal como tireoidite de Hashimoto ou bócio multinodular ou adenomatoso. Num estudo da Clínica Mayo com 596 doentes com PTC, 40% apresentavam doença benigna da tireoide concomitante, 33% tinham nódulos co-existent e 20% tireoidite de Hashimoto (Wartofsky, 2006).

Em nosso estudo, verificamos que 39,6% dos pacientes possuíam metástase linfonodal. Sabe-se que metástase do PTC afeta tecidos adjacentes à glândula tireoide, podendo causar sérios danos a essas estruturas. As regiões da traqueia, laringe, músculo do pescoço e esôfago são muito afetadas por esse problema e por isso os pacientes com PTC desenvolvem sintomas obstrutivos como disfagia, disfonia por paralisia de corda vocal, odinofagia, dispneia e hemoptises (Ohshima *et al.*, 2000; McCaffrey, 2006).

Outras alterações do estado geral do paciente com PTC como fadiga, anorexia e perda ponderal, poderão também indicar um tumor maligno avançado e sugerir invasão de estruturas adjacentes (Ohshima *et al.*, 2000; McCaffrey 2006).

Um achado de metástase nos pacientes com câncer de tireoide possui grande relevância, visto que o padrão de invasão causado pelas células metastáticas, provoca obstrução das vias aéreas e aumentam em, aproximadamente, 5 vezes a mortalidade dos pacientes com PTC (Ohshima *et al.*, 2000).

Recentes avanços na ultrassonografia endoscópica permitiram a visualização de detalhes das estruturas anormais formadas pela invasão das células tumorais. Wada *et al.*, 2003 estudaram 259 casos de PTC e descreveram vários padrões de metástase linfonodal. Destes, 64,1% (166/259) apresentaram metástase cervical central e 44,5% no compartimento lateral.

6.3. Dados bioquímicos

A secreção hipofisária de TSH regula a secreção de T_4 e T_3 , que por sua vez exercem *feedback* negativo no tireotrofo hipofisário, com uma relação log linear, conseqüentemente, pequenas alterações nas concentrações dos hormônios tireoidianos livres resultam em grandes alterações nas concentrações séricas de TSH, tornando-o melhor indicador de alterações discretas da produção tireoidiana (Andersen *et al.*, 2002).

Nossos resultados apontaram uma diferença importante na média dos valores de TSH e T_4L entre os períodos pré-operatório e pós-operatório. Este achado pode ser justificado pela redução dos hormônios tireoidianos causado pela tireoidectomia em pacientes com PTC.

O aumento nos níveis séricos de TSH está associado a um maior risco de desenvolvimento de câncer de tireóide, mesmo dentro dos parâmetros normais de referência (Moo *et al.*, 2010; Rego *et al.*, 2010).

Os níveis de TSH também estão associados à recorrência de PTC. A Associação Americana de Tireoide tem diretrizes para a reposição de TSH em pessoas que passaram por tireoidectomia para a remoção de PTC. Para pacientes com baixo risco de recorrência, recomendasse que os níveis de TSH devam ser mantidos entre 0,5 a 2 mU/L. Em pacientes com risco intermediário a alto, os níveis de TSH devem ser mantidos em valores baixos o suficiente para impedir qualquer tipo de crescimento de células na tireoide (Huang *et al.* 2017).

6.4. GENE *BRAF*

A mutação *BRAF*^{V600E} tem papel fundamental na gênese de diferentes tipos de tumores, a exemplo do câncer colorretal, melanoma e PTC (Fagin *et al.*, 2004). Estudos tem relatado que a mutação *BRAF*^{V600E} está associada a natureza mais agressiva do tumor, a maiores taxas de recorrência e mortalidade da doença (Xing *et al.*, 2013). Kimura *et al.*, 2003, foram os primeiros a identificarem a mutação *BRAF*^{V600E} em amostras de PTC. Estes pesquisadores, analisaram um total de 78 amostras com PTC e encontraram 28 com a mutação *BRAF*^{V600E}, representando um percentual de 36%.

Nos últimos anos, vários estudos em diferentes populações e áreas geográficas, foram conduzidos com a finalidade de elucidar a prevalência da mutação *BRAF*^{V600E} em amostras de PTC. Estes estudos revelaram que a prevalência varia entre 29% a 87%, confirmando que a mutação *BRAF*^{V600E} é a alteração genética mais comum encontrada em pacientes com PTC, com prevalência média de 45% (Fugazzola *et al.*, 2006).

No presente estudo, foram analisados exclusivamente os éxons 11 e 15 do gene *BRAF*, pois estes são os éxons que concentram a maioria das mutações para esse gene. As amostras foram de pacientes com PTC e sem histórico de casos na família e exposição à radiação ionizante.

Nossos resultados apontam uma alta prevalência da mutação *BRAF*^{V600E} (39,6% pacientes com PTC). Prevalência semelhante foi encontrada no estudo conduzido por Nikiforava *et al.* (2004). Estes pesquisadores analisaram 55 amostras de PTC de pacientes afetados pelo acidente nuclear de Chernobyl e 82 de pacientes com PTC esporádico. Os resultados apontaram uma baixa prevalência da mutação em PTC induzidas por radiação (4%), diferentemente dos tumores esporádicos, no qual a prevalência foi de 37%.

Resultados parecidos foram descritos por Cohen *et al.*, (2003). Este grupo de pesquisadores investigou 95 amostras de PTC excisados cirurgicamente, e identificaram 36 amostras com a mutação *BRAF*^{V600E} correspondendo uma prevalência de 38%.

Estudo de coorte realizado na cidade de São Paulo (Brasil) com 120 casos esporádicos de PTC resultou numa frequência de 48% da mutação *BRAF*^{V600E} (Cerutti, 2009). Em outro estudo multicêntrico na Itália, a análise de

260 casos de PTC, revelou uma prevalência de 38% dessa mutação. Ugolini *et al.*, (2007) estudaram 500 pacientes com PTC e identificaram uma frequência de 43,8% da mutação *BRAF*^{V600E}.

Os dados sobre a mutação *BRAF*^{V600E} são extensos na literatura e já foram descritos em diferentes populações, na maioria das vezes, com uma alta prevalência em PTC representando 90% das mutações encontradas nesses pacientes. Isso indica que esta mutação é um evento genético comum e específico no PTC e independe ou é pouco influenciada pela origem étnica e área geográfica estudada.

Vários grupos de pesquisa em diferentes países realizam estudos associando a mutação *BRAF*^{V600E} com características clinicopatológicas, tais como idade avançada, sexo masculino, rouquidão, tamanho do tumor, fenótipo agressivo, metástase e estadiamento tumoral mais avançado (Namba *et al.*, 2003; Riesco-Eizaguirre, 2006; Kebebew, 2007).

A despeito do grande número de estudos, a associação entre a mutação *BRAF*^{V600E} e as características clinicopatológicas permanecem controversas. A maioria das observações indica uma associação positiva da mutação com estádios avançados da doença e com fenótipo mais agressivo, entretanto alguns estudos não encontraram essas associações.

Nossos resultados indicaram associação significativa entre a mutação *BRAF*^{V600E} e os achados clínicos de rouquidão e metástase a distância ($p=0.0001$ e $p=0.0164$). Nossos achados para associação entre a *BRAF*^{V600E} e metástase linfonodal, estão de acordo como os encontrados por Namba *et al.*, 2003, os quais analisaram 126 pacientes com PTC e relataram associação positiva ($P= 0,033$). Outros estudos bem conduzidos em diferentes populações encontraram associação positiva entre a mutação *BRAF*^{V600E} e metástase (Fagin *et al*, 2004; Xing *et al.*, 2005).

A associação significativa entre a mutação *BRAF*^{V600E} e rouquidão é pouco descrita na literatura. Nguyen *et al.* (2015) justificam a rouquidão em pacientes com PTC, pelo fato de tumores na glândula tireoide poderem pressionar estruturas cervicais e provocar estes sintomas. Nikiforov *et al*; (2011) afirmam que sintomas como tosse, disfonia, dispneia, disfagia e rouquidão estão associados aos nódulos tireoidianos palpáveis e são sugestivos de malignidade, com foi observado em nossa amostra.

Uma variedade de alterações genéticas tem sido associada a carcinogênese da tireoide, a exemplo dos rearranjos RET/PTC e TRK, mutações no gene *TP53*, mas estas não puderam ser identificados no presente trabalho, o que possibilita novas pesquisas em nossa população. Acreditamos que estudos prospectivos são necessários para avaliar se o teste de mutação *BRAF^{V600E}* em conjunto com a avaliação de todos os fatores de risco clinicopatológicos convencionais (ex. subtipo histológico, encapsulação parcial ou completa) irão acrescentar significado preditivo e podem melhorar a condução e os resultados do tratamento para os pacientes com PTC.

6.5. GENE *K-RAS*

As mutações no gene *K-RAS* são predominantes em tumores pancreáticos (57,3%) e também são relatadas porcentagens significativamente altas em tumores do intestino grosso (34,7%), peritônio (28,3%), trato biliar (25,2%), intestino delgado (19,5%), pulmão (16,9%), endométrio (15,2%), ovário (12,4%) e cérvix (7,3%) (Moura *et al.*, 2015).

Até o momento, um pouco mais de uma dezena de mutações no gene *K-RAS* já foram descritas envolvidas no contexto do PTC. No presente estudo foi identificada a mutação nova, p.D38E no gene *K-RAS* em um indivíduo com PTC. Essa mutação está presente em uma região crítica do funcionamento da proteína KRAS, que consiste de um motivo conservado G box, que liga ao GTP temporariamente, resultando na ativação da quinase e sinaliza eventos *downstream*, que promovem a sobrevivência e a proliferação celular (Prior *et al.*, 2012).

Em condições fisiológicas, as proteínas RAS rapidamente hidrolisam o GTP a GDP, tornando a quinase inativa. As mutações descritas nessa região, normalmente, eliminam a atividade GTPase da proteína KRAS, tornando a quinase constitutivamente ativa e oncogênica (Schubbert *et al.*, 2007, Kislitsin *et al.* 2002; Fernández-Medarde & Santos, 2011).

Em geral, as mutações RAS são identificadas em 10-20% de carcinomas papilares (variante folicular), 40-50% de carcinomas foliculares e 20-40% de carcinomas poucos diferenciados (Capella 1991, Nikiforov, 2008). Elas estão presentes, principalmente, na porção catalítica da proteína KRAS (a exemplo

das mutações nos resíduos G12, G13 e Q61) sendo importantes eventos envolvidos no PTC. Por isso, o estudo dessas alterações ajuda a compreender os papéis críticos da proteína KRAS na patogênese do câncer de tireoide (Vasko *et al.*, 2004).

Além disso, as mutações pontuais nos genes *RAS* são mutuamente exclusivas com outras mutações do câncer de tireoide, tais como rearranjos *BRAF/RET* ou *TRK* em PTC. Nos carcinomas foliculares, as mutações *RAS* são mutuamente exclusivas com rearranjos *PAX8-PPARG* (Vasko *et al.*, 2004).

No câncer de tireoide já foram descritas um grande número de mutações em todas as 3 isoformas dos genes *RAS* (*HRAS*, *NRAS* e *KRAS*). Uma comparação das mutações nos genes *RAS* revela alguns padrões intrigantes, pois no gene *KRAS* tipicamente a maioria das mutações está nos códons 12 e 13, representando 96,3% das mutações detectadas (81,9 e 14,4% respectivamente), enquanto que as mutações que afetam o códon 61 representam apenas 1,6%. No gene *NRAS* o padrão de distribuição é diferente, com 60,9% das mutações ocorrendo no códon 61 e uma percentagem mais baixa de mutações encontradas nos códons 12 (23,4%) e 13 (11,4%). O *HRAS* tem um padrão intermediário de incidência entre o *KRAS* e *NRAS* (Prior *et al.*, 2012).

Em particular, o câncer de tireoide tem sido ligado à exposição a radiações ionizantes, bem como a vários carcinógenos químicos (Sipos & Mazzaferri, 2010). Porém, a história clínica do paciente com a mutação p.D38E não revela exposição a esses fatores de risco.

As características clínicas do paciente foram semelhantes às de pacientes previamente relatados com mutações no gene *KRAS* e os níveis de TSH e T4 livre (0,8 mUI/L, 3,2 ng/dL) do paciente podem estar associados com a resposta anormal da fisiologia da tireoide acometida pelo tumor. As mutações *RAS* também têm sido associadas a doenças mais agressivas e metástases, o que foi observado no paciente com a mutação p.D38E. (Garcia-Rostan *et al.*, 2003).

7. Conclusão

O presente estudo apontou alta prevalência de mutação *BRAF*^{V600E} em pacientes com PTC em nossa amostra, também revelou associação positiva entre a mutação *BRAF*^{V600E} e as características clinicopatológicas de metástase linfonodal e rouquidão. Esses dados estão de acordo com outros estudos envolvendo amostras desse tipo tumoral em outras localidades. Adicionalmente, a observação de uma nova mutação no gene *K-RAS* indica que o número de alterações gênicas envolvendo a via metabólica MAPK encontra-se ainda incompleto, fato que justifica a realização de novos estudos envolvendo o sequenciamento de genes dessa via. Os dados obtidos podem ser utilizados para uma melhor avaliação pré-cirúrgica de tumores tireoidianos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade para a detecção do câncer e evitar cirurgias desnecessárias de lesões erroneamente identificadas como malignas.

8. REFERÊNCIAS

- ABROSIMOV A, SAENKO V, ROGOUNOVITCH T, et al. Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical BRAF status. *Int J Cancer* 2007;120:196-200.
- ADENIRAN, A. J.; ZHU, Z.; GANDHI, M. *ET AL.* Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:216-22.
- ADRIENNE, D.; COX, AND CHANNING, J. Der. Ras history: The saga continues. *Mall GTPases* 1:1, 2-27; July/August 2010.
- AHN, B. H., Kim, J.R. Jeong, H.C Lee, J.S., Chang, E.S., Kim, Y.H. Predictive factors of central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Annals of Surgical Treatment and Research* 2015;88(2):63-68.
- ANDERSEN, S.; PEDERSEN, K. M.; BRUUN, N.H.; LAURBERG, P. Narrow individual variations in sérum T4 and T3 in normal subjects: a clue to understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1068-72.
- BAITEI, E. Y.; ZOU, M.; AL-MOHANNA, F. *ET AL.* Aberrant BRAF splicing as an alternative mechanism for oncogenic B-Raf activation in thyroid carcinoma. *J Pathol* 2009; 217:707-15.
- 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.
- BERTOLA, D. R.; PEREIRA, A. C. Brasil AS, Albano LM, Kim CA, Krieger JE. further evidence of genetic heterogeneity in Costello syndrome: involvement of the KRAS gene. *J HumGenet* 2007; 52:521-6.

- BOS, J.L. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res*; 49:4682-4689. 1989.
- BOUCAI, L.; HOLLOWELL, J.G.; SURKS, M.I. An approach for development of age, gender, and ethnicity-specific thyrotropin reference limits. *Thyroid*. 2011; 21:5-11
- BRYANT, K.L.; MANCIAS, J. D.; KIMMELMAN, A. L.; AND DER C.J: KRAS: feeding pancreatic câncer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences* February 2014, Vol. 39, No. 2
- BRZEZIANSKA, E.; PASTUSZAK-LEWANDOSKA, D.; WOJCIECHOWSKA, K. *ET AL.* Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Neuro Endocrinol Lett* 2007; 28:351-9.
- CAMBRUZZI, E.; PÊGAS, K.L.; MOLINARI, A.S.; DUARTE, M.R.; FERRARII, M.B. The relation between tumoral size and prognostic factors in 241 cases of thyroid papillary carcinom. *Revista da AMRIGS, Porto Alegre*, 55 (1): 58-63, jan.-mar. 2011.
- CAPELLA, G.; CRONAUER-MITRA, S.; PIENADO, M.A.; PERUCHO, M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect*. 1991 Jun; 93:125-31
- CARTA, C.; PANTALEONI, F.; BOCCHINFUSO, G.; STELLA, L.; VASTA, I.; SARKOZY, A.; DIGILIO, C.; PALLESCHI, A.; PIZZUTI, A.; GRAMMATICO, P.; ZAMPINO, G.; DALLAPICCOLA, B.; GELB, B. D.; TARTAGLIA, M. Germline missense mutations affecting KRAS isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am. J. Hum. Genet*. 79: 129-135, 2006.
- CERUTTI, J. M. Nodule diagnosed as follicular patterned lesion: Are biomarkers the promise? *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; 51:832-842.

- CIAMPI, R.; KNAUF, J. A.; KERLER, R. *ET AL.* Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005; 115:94-101.
- COELHO, S.M.; CARVALHO, D.P.; VAISMAN, M. New perspectives on the treatment of differentiated thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 51: 612-24. 2007.
- COHEN, Y.; XING, M.; MAMBO, E. *ET AL.* - BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(8):625-627.
- COOPER, G. M. & HAUSMAN, R. E. *A células: Uma Abordagem Molecular.* 3ª Edição, Porto Alegre: Artmed, 2007.
- DAVIES, H.; BIGNELL, G. R.; COX, C. *ET AL.* - Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002, 417(6892):949-954.
- DAVIES, L.; WELCH, H. G. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA* 2006; 295:2164–7.
- DE SOUZA, L.R.Q.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N.G.; RIBAS, C. A. P. M.; DE SOUZA, G. D.; MARINHO-JUNIOR, C.H. Citophotometric expression of Caspase-3 in papillary thyroid carcinoma in nodular goiter colloid. *Rev. Col. Bras. Cir*; 37(5): 316-322. 2010.
- DEANDREA, M.; MORMILE, A.; VEGLIO, M. *ET AL.* Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: Comparison between thyroid palpation and ultrasonography. *Endocr Pract.* 8: 282–286. 2002.
- DELELLIS, R.A.; LLOYD, R.V.; HEITZ P.U; ENG, C. *World Health Organization of Tumours, Pathology & Genetics. Tumors of Endocrine Organs.* 3 ed., Lyon: IARC Press; 2004.

- DEMIRAG, F.; ATALAY, E.; CRISS, W. E. Analysis of K-Ras oncogene codon 12 mutations in a series of human lung cancers. *Turkish Journal of Medical Sciences*, Ankara, v. 30, n. 2, p. 129-134, 2000.
- DENAYER, E, PARRET, A.; CHMARA, M.; SCHUBBERT, S.; VOGELS, A.; DEVRIENDT, K.; FRIJNS, J. P.; RYBIN, V.; DE RAVEL, T. J.; SHANNON, K.; COOLS, J.; SCHEFFZEK, K.; LEGIUS, E. Mutation analysis in Costello syndrome: functional and structural characterization of the HRAS p.Lys117Arg mutation. *Hum Mutat* 2008; 29:232–9.
- ELLIS, C. A.; CLARK, G. The importance of being K-Ras. *Cellular Signalling*, Oxford, v. 12, n. 7, p. 425-434, 2000.
- ERICKSON, L. A.; JIN, L.; NAKAMURA, N.; BRIDGES, A. G.; MARKOVIC, S. N.; LLOYD, R. V. Clinicopathologic features and BRAF(V600E) mutation analysis in cutaneous metastases from well-differentiated thyroid carcinomas. *Cancer* 2007; 109:1965-71.
- ESPINOSA, A. V, PORCHIA, L.; RINGEL, M. D. Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:16-20.
- Estimativa de incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017.
- FAGIN, J. A. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol* 2004;183:249-56
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M. *ET AL.*, eds. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase no. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed December 12, 2013.
- FERNÁNDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*. 2011 Mar; 2(3):344-58.

FERRAZ, C.; ESZLINGER, M.; PASCHKE, R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2016–2026. 2011.

FUGAZZOLA, L.; PUXEDDU, E.; AVENIA, N.; ROMEI, C.; CIRELLO, V.; CAVALIERE, A.; FAVIANA, P. *ET AL.* Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:455–64.

FUSCO, A.; VIGLIETTO, G.; SANTORO, M. A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. *J Clin Invest* 2005;115:20-3.

GARCIA-ROSTON, G.; ZHAO, H.; CAMP, L. *ET AL.* Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21:3226-3235.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6:313-9.

GOLBERT, L.; WAJNER, S.M.; ROCHA, A.P.; MAIA, A.L.; GROSS, J.L. Differentiated thyroid carcinoma: initial evaluation and follow-up. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 49: 701-10. 2005.

GRADÍSSIMO, V. Role of the BRAF gene alterations in the natural history of papillary thyroid carcinoma. Porto: Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina do Porto; 2008.

GUAN, H. J. I. M.; BAO, R. *ET AL.* Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:1612-7.

- HANDKIEWICZ-JUNAK, D.; CZARNIECKA, A. JARZAB, B. Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions. *Mol Cell Endocrinol*, doi:10.1016/j.mce. 2010.
- HOU, P.; LIU, D.; XING, M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle* 2007; 6:377-9.
- HUANG, H.; RUSIECKI, J.; ZHAO, N.; CHEN, Y.; MA, S.; YU, H.; WARD, M. H.; UDELSMAN, R.; ZHANG, Y. Thyroid-Stimulating Hormone, Thyroid Hormones, and Risk of Papillary Thyroid Cancer: A Nested Case–Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 26(8); 1209-18. 2017.
- ITO, Y.; YOSHIDA, H.; MARUO, R. *ET AL.* BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J* 2009; 56:89-97.
- KEBEBEW, E.; WENG, J.; BAUER, J.; *ET AL.* The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg.* 2007; 246:466-70; discussion 70-1.
- KIM, T. Y.; KIM, W. B.; SONG, J.Y. *ET AL.* The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63:588-93.
- KIMURA, E. T.; NIKIFOROVA, M. N.; ZHU, *ET AL.* - 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):1454-1457.
- KIMURA, E. T.; TINCANI, A. J.; WARD, L. S.; NOGUEIRA, C. R.; CARVALHO, G. A.; MAIA, A. L.; TAVARES, M. R.; TEIXEIRA, G.; KULCSAR, M. A. V.; BISCOLLA, R.P.M.; CAVALCANTI, C.E.O.; CORREA, L.A.C.; DEL NEGRO, A.; FRIGUGLIETI, C.U.M.; HOJAIJ, F.; ABRAHÃO, M.;

ANDRADA, N. C. Doença Nodular da Tireoide: Diagnóstico. Associação Médica Brasileira e Agência nacional de Saúde Complementar, 2011.

KISLITSIN, D.; LERNER, A.; RENNERT, G.; LEV, Z. K-ras mutations in sporadic colorectal tumors in Israel: unusual high frequency of codon 13 mutations and evidence for nonhomogeneous representation of mutation subtypes. *Dig Dis Sci.* 2002 May; 47(5):1073-9.

KUBRUSLY, M. S.; CUNHA, J E.; BACCHELLA, T.; ABDO, E. E.; JUKEMURA, J.; PENTEADO, S.; MORIOKA, C. Y.; SOUZA, L. J.; MACHADO, M. C. Detection of k-ras point mutation at codon 12 in pancreatic diseases: a study in a brazilian casuistic. *Journal of the pancreas, genova*, v. 3, n. 5, p. 144-151, 2002.

KUMAGAI, A.; NAMBA, H.; SAENKO, V. A. *ET AL.* Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4280-4.

LA VECCHIA, C.; MALVEZZI, M.; GARAVELLO, W.; BERTUCCIO, P.; LEVI, F. AND NEGRI, E. *Int. J. Cancer:* 136, 2187–2195 (2015). Thyroid cancer mortality and incidence: A global overview.

LIMA, J.; TROVISCO, V.; SOARES, P. *ET AL.* BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4267-71.

LOPES, J. P.; FONSECA, E. Mutaç o do gene *BRAF* na hist ria natural do carcinoma papilar da tireoide: implica es diagn sticas e progn sticas. *Acta Med Port.* 2011; 24(S4):855-868.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews – Cancer – Nature Publishing Group, London*, v. 3, n. 6, p. 7-13, 2003.

MATSUO E, SILVA. MARTINS L. LEONI G S. HAJJAR D. RICART E FILHO JCM. EBINA KN. KIMURA ET. Marcadores Biológicos de Tumores Tiroidianos. Arq Bras Endocrinol Metab vol 48 nº 1 Fevereiro 2004.

MCCAFFREY, J. C. Aerodigestive tract invasion by well-differentiated thyroid carcinoma: diagnosis, management, prognosis, and biology. Laryngoscope 2006;116:1-11

MEDEIROS-NETO, N. Carcinoma Papilífero da Tireoide: Uma Hidra de Sete Cabeças. Arq Bras Endocrinol Metab vol 47 nº 3 Junho 2003.

MOHEBATI, A.; SHAHA, A.R. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. Clin Anat. 2012 Jan; 25(1):19-31.

MONACO, F. Classification of thyroid diseases: suggestions for a revision. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 88, Issue 4, 1 April 2003.

MOON, H.J., KWAK, J.Y., KIM, M.J., SON, E.J. Can vascularity at power Doppler US Help Predict thyroid malignancy? Radiology. 2010. April, 255 (1):260-9.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

MORETTI, S.; MACCHIARULO, A.; DE FALCO, V. *ET AL*. Biochemical and molecular characterization of the novel BRAF (V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. Oncogene 2006; 25:4235-40.

MOURA, M.M.; CAVACO, B.M.; LEITE. V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma. Endocr Relat Cancer. 2015 Oct; 22(5):R235-52. doi: 10.1530/ERC-15-0070.

NAMBA, H.; NAKASHIMA, M.; HAYASHI, T.; *ET AL.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4393-7

NGUYEN, Q.T.; LEE, E.J.; HUANG, M.G.; PARK, Y.I.; KHULLAR, A.; PLODKOWSKI, R.A. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Health Drug Benefits*. 2015 Feb;8(1):30-40

NIKIFOROV Y.E. Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets. **Mod Pathol**. 2008.

NIKIFOROV, Y.E.; OHORI, N.P.; HODAK, S.P.; CARTY, S.E.; LEBEAU, S.O.; FERRIS, R.L.; YIP, L.; SEETHALA, R.R.; TUBLIN, M.E.; STANG, M.T.; COYNE, C.; JOHNSON, J.T.; STEWART, A. F.; NIKIFOROVA, M. N. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 96:3390–3397. 2011.

NIKIFOROVA, M.N.; CIAMPI, R.; SALVATORE, G.; *ET AL.* Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett* 2004; 209:1-6.

NIKIFOROVA, M.N.; KIMURA, E.T.; GANDHI, M. *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; 88:5399-404.

NUCERA, C.; GOLDFARB, M.; HODIN, R.; PARANGI, S. Role of B-Raf(V600E) in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-Raf(V600E), 2009.

OHSHIMA, A.; YAMASHITA, H.; NOGUCHI, S. Endoscopic ultrasonography in the evaluation of thyroid cancer invasion into the esophagus. *Surgery* 2000; 127:478-9

OIKONOMOU, E.; KOUSTAS, E.; GOULIELMAKI, M.; PINTZAS, A. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget*. 2014 Dec 15;5(23):11752-77.

OLIVEIRA, J.B.; BIDERE, N.; NIEMELA, J. E.; ZHENG, L.; SAKAI, K.; NIX, C. P.; DANNER, R. L.; BARB, J.; MUNSON, P. J.; PUCK, J. M.; DALE, J.; STRAUS, S. E.; FLEISHER, T. A.; LENARDO, M. J. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:8953–8.

PARK, Y. J.; KIM, Y. A.; LEE, Y. J. *ET AL*. Papillary microcarcinoma in comparison with larger papillary thyroid carcinoma in BRAF (V600E) mutation, clinicopathological features, and immunohistochemical findings. *Head Neck* 2009.

PRIOR, I. A.; HANCOCK, J. F. Compartmentalization of Ras proteins. *Journal of Cell Science*, London, v. 114, n. 9, p. 1603-1608, 2001.

PRIOR, I.A.; LEWIS, P.D. and MATTOS, C. A. Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. May 2012.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E & BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews. Cancer* 761–774. doi:10.1038/nrc3106. 2011.

REGO, T., FIORE, E., Scutare, M., SANTINI, F., DI COSCIO, G., ROMANI, R., PIAGGI, P., UGOLINE, C., BASOLI, F., MICCOLI, P., PINCHERA, A., VITTE, P. Male sex, single nodularity, and young age are associated with the risk of finding a papillary thyroid cancer on fine-needle aspiration cytology in a large series of patients with nodular thyroid disease. *Eur J. Endocrinol*. 2010. April 162 (4): 763-70.

REUTER, C. W. M.; MORGAN, M. A.; BERGMANN, L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*, New York, v. 96, n. 5, p. 1655-1669, 2000.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G.; GUTIERREZ-MARTINEZ, P.; GARCIA-CABEZAS, M.A.; NISTAL, M.; SANTISTEBAN, P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:257-69

RODRIGUES, A.S.S. MOLECULAR BIOLOGY IN THE PROGNOSIS OF THYROID CARCINOMA. *Rev. Col. Bras. Cir.* Vol. 30 - Nº 6, Nov/Dez. 2003.

SADOW, PM.; HEINRICH, M. C.; CORLESS, C. L.; FLETCHER, J. A.; NOSÉ, V. Absence of BRAF, NRAS, KRAS, HRAS mutations, and RET/PTC gene rearrangements distinguishes dominant nodules in Hashimoto thyroiditis from papillary thyroid carcinomas. *Endocr Pathol.* 2010 Jun; 21(2):73-9. doi: 10.1007/s12022-009-9101-3.

SCHLUMBERGER, M.J. Papillary Thyroid Carcinoma. *Orphanet Encyclopedia*, March 2004.

SCHUBBERT, S.; SHANNON, K.; BOLLAG, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):295-308.

SEDLIAROU, I.; SAENKO, V.; LANTSOV, D.; *ET AL.* The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int J Oncol* 2004; 25:1729-35.

SIPOS, J.A.; MAZZAFERRI, E.L. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2010 Aug; 22(6):395-404

- SYKOROVA, V.; DVORAKOVA. S.; RYSKA, A. ET AL. BRAFV600E Mutation in the Pathogenesis of a Large Series of Papillary Thyroid Carcinoma in Czech Republic. *J Endocrinol Invest* 2009.
- TAKADA, H; KIKUMORI, T; IMAI, T; SAWAKI, M; SHIBATA, A; KIUCHI, T. Patterns of Lymph Node Metastases in Papillary Thyroid Carcinoma: Results from Consecutive Bilateral Cervical Lymph Node Dissection. *World J Surg* (2011) 35:1560–156.
- TAKAHASHI, K.; EGUCHI, H.; ARIHIRO, K. ET AL. The presence of BRAF point mutation in adult papillary thyroid carcinomas from atomic bomb survivors correlates with radiation dose. *Mol Carcinog.* 46:242-8. 2007
- TANG, K.T.; LEE, C. H. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. *J Chin Med Assoc*, March 2010, Vol 73, No 3.
- TROVISCO, V.; DE CASTRO, I.; SOARES, P. ET AL. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004; 202:247-51
- TUTTLE, R. M. ET AL. Thyroid carcinoma. *J. Natl Compr. Canc. Netw.* 8, 1228–1274 (2010).
- TYNER, J.W.; ERICKSON, H.; DEININGER, M.W.; et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood.*113:1749–55, 2009.
- UGOLINI, C.; GIANNINI, R.; LUPI, C. ET AL. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2007; 17:381-8.
- VARTANIAN, JG. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Tireoide. *Onco & março/abril* 2013.

- VASKO, V.V.; GAUDART, J.; ALLASIA, C.; SAVCHENKO, V.; DI CRISTOFARO, J.; SAJI, M.; RINGEL, M.D.; DE MICCO, C. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2004 Dec; 151(6):779-86.
- WADA, N.; DUH, Q.; SUGINO, K.; IWASAKI, H.; KAMEYAMA, K.; MIMURA, T.; ITO, K.; TAKAMI, H.; TAKANASHI Y. *ANNALS OF SURGERY.* Vol. 237, No. 3, 399–407. 2003.
- WAN, P.T.; GARNETT, M.J.; ROE, S.M, *ET AL.* Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116:855-67.
- WANG, Y.; JI, M.; WANG, W. *ET AL.* Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15:183-90.
- WARTOFSKY, L. Papillary Carcinoma Clinical Aspects. In: *Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management 2/e* (L. Wartofsky and D. Van Nostrand), pp253-260, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006
- XING M, ALZHRANI AS, CARSON KA, VIOLA D, ELISEI R, BENDLOVA B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA.* 2013:3091493–501
- XING, M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12:245-62.
- XING, M. Z. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28:742-62.

YANG, J, GONG, Y, SHUPING YAN, S, ZHU, J, LI, Z AND GONG, R. Risk factors for level V lymph node metastases in solitary papillary thyroid carcinoma with clinically lateral lymph node metastases. *Cancer Medicine*, 2016.

YIP L, NIKIFOROVA MN, CARTY SE, et al. Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation. *Surgery* 2009; 146:1215-23.

ZIDAN, J.; KAREN, D.; STEIN, M.; ROSENBLATT, E.; BASHER, W.; KUTEN, A. Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma: clinical features, prognostic factors, treatment, and survival. *Cancer*; 97: 1181-1815. 2003.

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRAFID828.html>. Acessado em 30 de junho de 2017.

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=braf>. Acessado em 20 de outubro de 2017.

<http://lab-siviero.icb.usp.br/biocel/modulos/secrecao-de-hormonios-tireoidianos>. Acessado em 25 novembro de 2017.