



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS DE PASSO FUNDO

CURSO DE MEDICINA

LUIZA ROSSO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREOIDE**

PASSO FUNDO

2019

LUIZA ROSSO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIROIDE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação para
obtenção do título de bacharel em Medicina da
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador (a): Prof. Me. Josiane Borges Stolfo.

PASSO FUNDO

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Silva, Luiza Rosso da
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM
CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE / Luiza Rosso da
Silva. -- 2019.
55 f.:il.

Orientadora: Mestre Josiane Borges Stolfo.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Medicina, Passo Fundo, RS , 2019.

1. Neoplasias da glândula tireoide. . 2. Proteínas
proto-oncogênicas B-RAF.. 3. Carcinoma papilífero de
tireoide. . I. Stolfo, Josiane Borges, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

LUIZA ROSSO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Prof. Me. Josiane Borges Stolfo

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Josiane Borges Stolfo – UFFS

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti – UFFS

Prof. Dra. Ciciliana Rech - UFFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar para o melhor caminho, por me dar forças e suporte quando necessário e pela benção de ter colocado pessoas incríveis ao meu redor.

Agradeço aos meus pais, Sandro e Adriana, por todo o amor, apoio e confiança sempre depositados em mim e por não medirem esforços para fazer com eu me torne uma pessoa cada vez melhor e mais feliz. Ao meu irmão, Augusto, por conseguir me fazer sorrir até nos momentos mais difíceis e por me mostrar que a vida sempre pode ser mais alegre e divertida do que imaginamos.

Ao meu namorado André, que estando longe ou perto, me compreende e se dedica aos meus sonhos junto comigo.

Aos meus avós, por toda compreensão, orações e auxílio, de diversas maneiras, durante minha caminhada, desde pequena. À minha tia, Franciele, por sempre estar disposta a ajudar e por contribuir significativamente pelo meu interesse em pesquisas científicas.

À minha orientadora, professora Josiane, por ter possibilitado que esse estudo fosse realizado. Sua paciência, dedicação, apoio e seus ensinamentos para tornar nosso trabalho realidade certamente contribuíram imensamente para minha formação como médica.

Ao Instituto de Patologia de Passo Fundo, instituição a qual sou imensamente grata, por ter possibilitado a realização do projeto de pesquisa, incluindo os profissionais que dedicaram seu tempo para nos auxiliar.

À todos familiares e amigos que, de inúmeras formas, trazem apoio e torcida pelo meu sucesso. Tenho tantas pessoas especiais por perto e que mereceriam agradecimentos pela importância que tem em minha vida, que não caberiam em um texto. Obrigada a todos que me incentivam a crescer, aprender e me aperfeiçoar como ser humano!

RESUMO

O estudo “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE” foi realizado pela aluna Luiza Rosso da Silva, estudante de Medicina da UFFS – campus Passo Fundo, sob orientação da Prof. Me. Josiane Borges Stolfo, entre os anos de 2017 e 2019, na cidade de Passo Fundo e faz parte do Trabalho de Conclusão de Curso da graduação para obtenção do título de bacharel em Medicina. O intuito do trabalho é analisar a relação entre a expressão da proteína BRAFV600E e determinadas variáveis, em pacientes diagnosticados com carcinoma papilífero de tireoide, para avaliação da correlação clínico-patológica entre elas. O estudo está em conformidade com o Manual de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal da Fronteira Sul, 2º edição, revisado e atualizado no ano de 2015. Este volume é composto por 3 capítulos: Projeto de pesquisa, Relatório e Artigo científico. O primeiro foi desenvolvido na disciplina de Pesquisa em Saúde, no segundo semestre de 2017, e visa esclarecer o delineamento do estudo, assim como os objetivos, hipóteses e a metodologia utilizada para chegar aos resultados. No Relatório, desenvolvido na disciplina TCC I, no segundo semestre de 2018, constam informações importantes acerca do cronograma realizado e da logística empregada, assim como as alterações realizadas ao longo do estudo. No Artigo, desenvolvido na disciplina de TCC II, no primeiro semestre de 2019, são apresentados os resultados da pesquisa e a discussão.

Palavras-chave: Neoplasias da glândula tireoide. Carcinoma papilífero de tireoide. Proteínas proto-oncogênicas B-RAF.

ABSTRACT

The study “ANALYSIS OF THE BRAFV600E PROTEIN EXPRESSION IN THYROID PAPILLARY CARCINOMAS” was carried out by the student Luiza Rosso da Silva, medicine student at UFFS – Passo Fundo campus, under the guidance of Professor Josiane Borges Stolfo, between 2017 and 2019 in Passo Fundo city. The study is part of the final thesis for obtaining the title of Bachelor in medicine. The purpose of the study is to analyse the relation between the expression of the BRAFV600E protein and certain variables in patients diagnosed with thyroid papillary carcinomas, analysing if there is any association between the patients and the prognosis. This section is composed by 3 chapters: research project, report and scientific article. The research project was carried at the discipline of TCC I, at the second semester of 2017, aiming to clarify the study design, just as the objectives, hypotheses and the methodology used to achieve the results. In the report, developed at the discipline of TCC I on the second semester of 2018, is provided important information concerning the chronogram applied and the logistic adopted, as well as the changes applied in the course of the study. The article elaborated in the discipline of TCC II, on the first semester of 2019, contains the results and the discussion.

Keywords: Thyroid Neoplasms. Papillary Thyroid Carcinoma. Proto-Oncogene Proteins B-raf.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK de sinalização	17
--	----

LISTA DE SIGLAS

CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MCPT	Microcarcinoma papilífero de tireoide
NIC	<i>Nacional Cancer Institute</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TH	Tireoidite de Hashimoto
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma Vírus</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
SSI	Simporte de sódio-iodeto
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1.	PROJETO DE PESQUISA.....	12
2.1.1	RESUMO	12
2.1.2.	TEMA	13
2.1.3.	PROBLEMA.....	13
2.1.4.	HIPÓTESES.....	13
2.1.5.	OBJETIVOS	13
2.1.5.1	Objetivo Geral	13
2.1.5.2	Objetivos Específicos	13
2.1.6.	JUSTIFICATIVA.....	13
2.1.7.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1.8.	METODOLOGIA	21
2.1.8.1	Tipo de estudo	21
2.1.8.2	Local e período de realização	21
2.1.8.3	População e amostragem	21
2.1.8.4	Variáveis e instrumentos de coleta de dados	21
2.1.8.5	Logística.....	22
2.1.8.6	Processamento, controle de qualidade e análise dos dados.....	22
2.1.8.7	Aspectos éticos.....	22
2.1.9.	RECURSOS	24
2.1.10	CRONOGRAMA	25
2.1.11	REFERÊNCIAS	26
2.1.12	APÊNDICES.....	29
2.2	RELATÓRIO	34
2.2.1	APRESENTAÇÃO	34
2.2.2	DESENVOLVIMENTO.....	34
2.2.2.1	LOGÍSTICA E COLETA DE DADOS	34
2.2.2.2	PERDAS E RECUSAS	35
2.2.3	CONCLUSÃO	36
3	ARTIGO.....	42

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino e compõe cerca de 1% de todos os cânceres (FRASER et al., 2016). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para 2016 foi de 5.870 casos novos para o sexo feminino e de 1.090 para o sexo masculino no Brasil, evidenciando um maior acometimento da população feminina, principalmente entre a faixa etária dos 20 aos 50 anos. Ainda, segundo estimativas do INCA, na região Sul do país cerca de 5,2 mulheres são afetadas a cada 100 mil. Os principais tipos histológicos de carcinomas da tireoide são os carcinomas papilíferos, foliculares, medulares e anaplásicos. Por variarem em relação à célula de origem e ao grau de diferenciação, possuem diferentes manifestações e prognósticos.

O carcinoma papilífero da tireoide (CPT) é o tipo histológico mais comum, correspondendo à 85% dos casos (FAGIN; WELLS, 2016). Segundo Davies e Welch (2010), possui uma evolução indolente, com uma sobrevida de 95% em 10 anos, consequência do lento crescimento das células neoplásicas e do baixo potencial metastático das mesmas. Nos últimos anos, houve um aumento de casos de cânceres de tireoide, atribuído exclusivamente ao CPT. Essa variação é resultado de um maior número de diagnósticos, o que ocorreu devido às técnicas de imagem e de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (JIANG; CHU; ZHENG, 2015). Há estudos demonstrando que também houve um real aumento no número de casos, uma vez que, além de ter sido identificado aumento nos casos de lesões maiores e mais avançadas, as lesões menores também apresentaram pior evolução, demonstrando que mesmo os pacientes com diagnóstico e tratamento precoces tiveram sobrevida reduzida (DAVIES; WELCH, 2014; VIGNERI et al., 2015). Assim, nota-se a ocorrência de casos de neoplasias papilíferas agressivas e com tendência a metastizar e recorrer. Esses eventos podem ser explicados pela ocorrência de mutações genéticas descobertas recentemente, as quais têm sido estudadas com o propósito de prever a evolução do quadro, para que tratamentos mais agressivos sejam iniciados de forma precoce, se for necessário. A principal forma de rastrear nódulos de tireoide é a PAAF e a partir dela, pode-se determinar se a tumoração é maligna ou benigna. Entretanto, em 10-30% dos casos, o resultado é indeterminado (JIANG; CHU; ZHENG, 2015), sendo necessária a avaliação anatomopatológica do nódulo por ressecção cirúrgica completa, buscando critérios nucleares para o diagnóstico de CPT ou a existência de invasão capsular ou vascular, critérios importantes para o diagnóstico de carcinomas foliculares. Com o intuito de melhorar a acurácia da citopatologia, novos recursos estão sendo estudados e entre eles estão

os biomarcadores (HAYES et al., 1996). Podem ser usados como um método não invasivo, para diagnóstico e acompanhamento da resposta ao tratamento, estimar o volume do tumor e indicar prognóstico da doença. Nesse contexto, as mutações do gene BRAF (*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) têm grande importância em relação à neoplasia em questão.

O gene BRAF pertence à classe dos oncogenes e quando mutado, expressa proteínas que ativam a via MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) continuamente, estimulando de forma desregulada o crescimento, divisão e diferenciação celular, causando a neoplasia. A principal mutação é a BRAF^{V600E}, a qual ocorre no cromossomo 7, onde há a troca de um aminoácido valina por um ácido glutâmico, no códon 600, sintetizando uma proteína alterada (XING, 2005). Segundo Nikiforova (2008), essa mutação compõe de 25% a 85% das mutações do BRAF, variando conforme a população e o subtipo histológico. É encontrada em 32% a 73% dos CPT e em alguns carcinomas anaplásicos derivados de CPT (ELMAGEED et al., 2016), não sendo relatada nos outros tipos histológicos, nem nos tumores benignos ou tecido tireoidiano saudável, o que o caracteriza como um marcador diagnóstico quando encontrado em amostras da glândula (XING et al., 2005). A importância clínica dessa mutação tem sido discutida nos últimos anos e ainda não há consenso sobre sua aplicação clínica. Com o aprimoramento dos conhecimentos e das técnicas de identificação da proteína alterada, atualmente já existem evidências de que o BRAF^{V600E} é associado a um pior prognóstico para a doença e é relacionado a maiores índices de metástases, de recorrência após tireoidectomia e de resistência à radioiodoterapia (XING et al., 2005). Entretanto, alguns pesquisadores afirmam a inexistência de tal associação e sugerem que a presença da proteína BRAF600E pode ser usada somente como preditora de oncogênese (ZHANG et al., 2016)^A. Existem diversos métodos para detecção da mutação BRAF^{V600E}, dentre eles, a imunohistoquímica (IHQ). Esse foi o escolhido para realização do presente trabalho, com o intuito de avaliar a expressão da proteína de forma retrospectiva. A escolha do método deve-se a estudos que comprovaram sua acurácia e suas altas taxas de sensibilidade e especificidade (ELMAGEED et al., 2016).

Desenvolver testes confiáveis que auxiliem em um estadiamento mais preciso faz-se necessário, uma vez que, a partir desse, define-se o tratamento e a forma de acompanhamento do paciente. Ao identificar o perfil da neoplasia, sabe-se qual é o seu potencial, o que interfere diretamente na qualidade de vida e na sobrevivência do paciente. Nesse sentido, o estudo da relação entre a expressão da proteína do BRAF^{V600E} e as características clínico-patológicas da neoplasia, pode estabelecer se sua presença deve ou não ser considerada e o quanto ela influencia no desfecho dos pacientes.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1. PROJETO DE PESQUISA

2.1.1 RESUMO

O presente estudo é do tipo observacional transversal descritivo analítico e consiste na avaliação da expressão da proteína BRAFV600E em carcinomas papilíferos de tireoide, com o intuito de relacioná-la aos dados clínico-patológicos do indivíduo. Serão avaliadas amostras de pacientes submetidos à ressecção parcial ou total de tireoide devido à presença do CPT, entre 1º de janeiro de 2016 e 31 de dezembro de 2017, as quais serão identificadas pelos pesquisadores por um número de registro. Essas, encontram-se armazenadas no biobanco de um laboratório no norte do Rio Grande do Sul, onde também será realizada a coleta dos dados dos pacientes, a partir do banco de dados da instituição. A determinação da expressão proteica ocorrerá a partir de Imunohistoquímica, a partir da reação com os anticorpos monoclonais RM8 Rmab Biosb 0,1 mL. Os resultados serão relacionados à idade e sexo do paciente, subtipo do carcinoma, tamanho da lesão primária, multifocalidade, presença ou não de extensão extratireoidiana, invasão vascular ou linfática e metástases linfonodais. Ao relacionar a expressão da proteína BRAFV600E a essas características, será verificado se a mesma associa-se àquelas que, de acordo com a literatura revisada, são indicativas de pior prognóstico. Se a hipótese confirmar-se, o estudo contribuirá para que a expressão da BRAFV600E seja utilizada futuramente como forma de compor o perfil da neoplasia, o que auxilia na acurácia do prognóstico no momento do diagnóstico, implicando em condutas mais agressivas desde o início do tratamento. Portanto, por tratar-se de uma neoplasia comum, com cerca de 7 mil casos no Brasil em 2016, definir tais características acerca da mesma é de grande importância, tendo em vista que contribuirão para um manejo eficaz de inúmeros pacientes durante o curso da doença.

2.1.2. TEMA

Carcinomas papilíferos de tireoide.

2.1.3. PROBLEMA

É possível analisar, usando marcadores moleculares, a relação entre a expressão da proteína BRAF^{V600E} e as características clínico-patológicas do carcinoma papilífero de tireoide?

2.1.4. HIPÓTESES

A expressão da proteína BRAF^{V600E} associa-se às características clínico-patológicas agressivas do carcinoma papilífero de tireoide.

2.1.5. OBJETIVOS

2.1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão da proteína BRAF^{V600E} em carcinomas papilíferos de tireoide e relacionar com dados clínico-patológicos.

2.1.5.2 Objetivos Específicos

Analisar, a expressão do BRAF^{V600E} em carcinomas papilíferos de tireoide, relacionando à idade, sexo, subtipo do carcinoma, tamanho da lesão primária, multifocalidade, presença ou não de extensão extratireoidiana, invasão vascular ou linfática e metástases linfonodais.

2.1.6. JUSTIFICATIVA

O carcinoma papilífero é o tipo histológico mais comum de carcinoma de tireoide, representando de 60 a 80% dos casos, segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. A incidência dessa neoplasia é alta e compõe cerca de 5% dos cânceres femininos, sexo mais acometido pela doença. Atualmente, estima-se que um em cada mil indivíduos será acometido durante sua vida e, apesar do número de casos ser alto, aproximadamente 7 mil casos no Brasil, no ano de 2016, as taxas ainda estão crescendo, tanto pelo melhora nas técnicas diagnósticas, quanto por um aumento verdadeiro no número de acometimentos. O CPT é, de modo geral, uma neoplasia indolente e apresenta taxas de sobrevida de 90% em 10 anos. Entretanto, como ocorre também em outros tipos de câncer, essa neoplasia possui variantes

agressivas, relacionadas a um pior prognóstico para o paciente. Considerando a alta prevalência dessa neoplasia, é necessário que haja recursos disponíveis para que seja avaliado, de forma segura e precoce, o perfil da neoplasia do paciente, o que resulta em condutas médicas mais eficazes.

Relacionar a presença da proteína BRAF^{V600E} à evolução da neoplasia, torna possível melhorar a acurácia do prognóstico no momento do diagnóstico, o que possibilita iniciar um tratamento mais agressivo antecipadamente, definir mais precisamente a extensão cirúrgica e como será o acompanhamento do paciente, reduzindo as chances de que o tumor recorra ou torne-se resistente à terapia posteriormente.

2.1.7. REFERENCIAL TEÓRICO

O câncer de tireoide, principal neoplasia endócrina, é a causa de 5-10% dos nódulos dessa glândula (XING, 2005) e, com excessão do tipo histológico medular, que se desenvolve a partir das células parafoliculares, é originado das células foliculares da tireoide. Dentre as apresentações dos carcinomas tireoidianos, tem-se o papilífero como a principal, devido a sua grande prevalência (FAGIN; WELLS, 2016). É assim chamado por possuir arquitetura papilar, entretanto, hoje sabe-se que pode apresentar-se de outras formas, devido às suas variantes. O CPT é pouco agressivo e tem altas taxas de cura, devido ao seu lento crescimento e baixa tendência em metastizar (AMERICAN THYROID ASSOCIATION, 2009), entretanto, em alguns casos, pode recorrer e tornar-se incurável, levando o paciente à morte.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (NIC) dos EUA (2017), a neoplasia maligna de tireoide afeta principalmente mulheres jovens com história de bócio e história familiar de doenças da tireoide. Desordens genéticas, como neoplasias endócrinas múltiplas, descendência asiática e a expressão do gene RET também favorecem o desenvolvimento da neoplasia. A exposição prévia à radiação ionizante, principalmente durante a infância, é um importante fator de risco para o CPT, visto que após o acidente nuclear em Chernobyl e a explosão das bombas atômicas em Hiroshima e Nagasaki, houve um significativo aumento na incidência desse câncer. Nesse âmbito, verificou-se que crianças submetidas à radioterapia na cabeça ou pescoço são também mais suscetíveis (RABES et al., 2000). Ainda segundo o NIC, o diagnóstico é realizado a partir da história e exame clínico do paciente, dos níveis séricos hormonais, da PAAF, de exames de imagem, principalmente a ultrassonografia, e da avaliação da peça ressecada, se necessário. No caso do CPT, o diagnóstico pode ser realizado apenas pelo exame citológico, através do material da PAAF. Nesse, alterações nucleares específicas dessa neoplasia são encontradas: entalhe nuclear, núcleo opticamente vazio e pseudoinclusão nuclear, além de outras características, como o psamoma, que corroboram o diagnóstico por serem mais prevalentes nesse tipo histológico. Após o resultado, pode-se, então, avaliar o estágio do tumor.

O estadiamento do câncer de tireoide leva em consideração inúmeros fatores, os quais serão importantes para predizer a evolução do quadro e para direcionar a conduta médica, evitando casos tumores recorrentes e refratários ao tratamento. O prognóstico para o câncer papilífero de tireoide tem como principal fator a idade. Segundo Sanders e Cady (1998), homens com menos de 40 anos e mulheres com menos de 50, sem metástases, têm grandes chances de uma boa evolução da patologia, assim como os indivíduos idosos com carcinomas papilíferos menores de 5cm e sem invasão extratireoidiana. Além da idade e gênero, o tamanho do tumor

primário, invasão capsular, ressecção cirúrgica completa, metástases linfonodais e à distância e gradação do tumor (AMERICAN THYROID ASSOCIATION, 2015) também fazem parte do estadiamento. Outros marcadores têm auxiliado na acurácia do prognóstico para esse tipo de neoplasia. O fator de crescimento endotelial vascular foi associado à recorrência e à metástases a distância (LENNARD et al., 2001), e níveis séricos aumentados de tireoglobulina em pacientes pós-cirúrgicos têm forte relação com recorrência local (YANG et al., 2015). Em relação às mutações gênicas, sabe-se que são fundamentais, tanto para a oncogênese, quanto para a evolução neoplásica. Muitas ainda seguem inconclusivas quanto ao seu valor prognóstico e algumas já estão estabelecidas, como é o caso da expressão de p53, a qual, segundo Nishida *et al.* (1996), marca uma neoplasia extremamente agressiva. Assim, percebe-se que além do estadiamento comumente realizado, tem-se outros recursos para auxiliar no prognóstico. Nesse contexto, o oncogene BRAF mostra-se importante.

As principais mutações encontradas no CPT alteram a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da PI3K-AKT. As mais comuns são o rearranjo de RET/PTC e PAX8/PPAR γ e as mutações pontuais no genes RAS e BRAF (COHEN et al., 2003; TANG et al., 2010; NIKIFOROV, 2011). O gene BRAF faz parte da via RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK, que envia estímulos ao núcleo para iniciar a proliferação e diferenciação celular, assim, quando essa está mutada, participa da oncogênese tireoidiana. Esse oncogene é expresso em 43%-88,3% dos carcinomas papilíferos (LUPI et al., 2007; ZHANG et al., 2016)^B e tem como principal alteração a troca do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600 (V600E). BRAF^{V600E} possui elevada atividade serina/treonina, o que mantém a via MAPK constantemente ativada, aumentando a proliferação celular sem estímulo prévio, ou seja, a célula passa a se reproduzir independentemente (DAVIES et al., 2002). Deve-se considerar, entretanto, que a mutação BRAF^{V600E} não é capaz de causar uma neoplasia “por si só” necessitando de alterações genéticas e epigenéticas adicionais (SHIMAMURA et al., 2013).

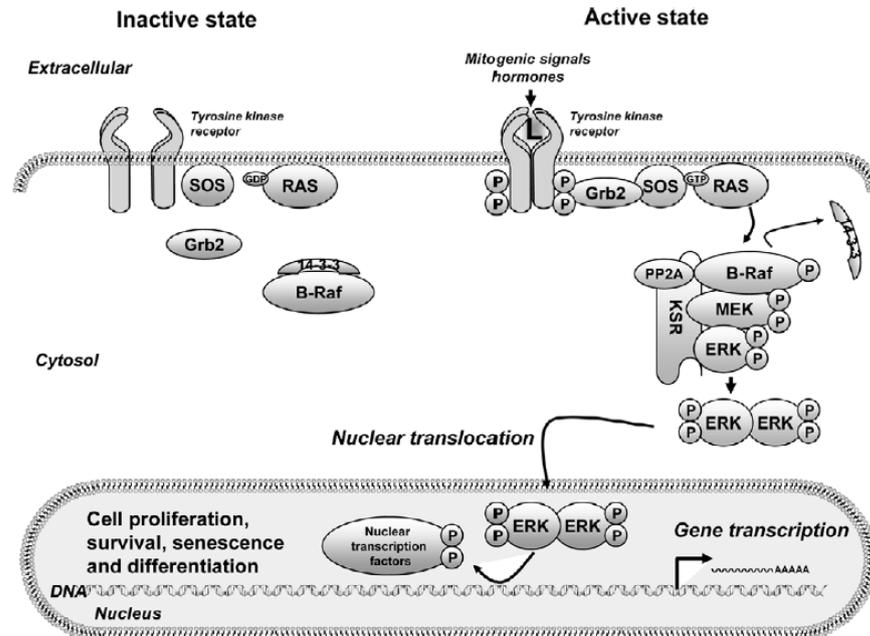


Figura 1: Via RAS-RAF-MEK-ERK/MAPK de sinalização. Ativada por mitógeno, em situações normais. TANG, K; LEE, C. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. Journal of the Chinese Medical. v. 3, ed. 3, p. 113-2, 2010.

A maioria dos pesquisadores avaliaram a relação da expressão da proteína BRAF^{V600E} com o comportamento do carcinoma papilífero considerando aspectos como invasão extratireoidiana, metástases linfonodais e a distância e estágios avançados no TNM, uma vez que esses representam tanto uma neoplasia agressiva, quanto um pior prognóstico para o paciente. A partir de 2002, quando Davies *et al.* descreveram a mutação, muitos estudos foram realizados.

Xing *et al.* (2005), avaliou as características clínico-patológicas do CPT inicial e o curso clínico do mesmo por um período de 14 anos, encontrando relação entre a BRAF^{V600E} e estágios avançados do tumor, metástases linfonodais e invasão extratireoidiana. Também foi relatada associação com maiores taxas de recorrência, mesmo em tumores menores, e com refratariedade do tumor recorrente à radioiodoterapia. Nesse estudo, a idade, gênero e multifocalidade não se relacionaram significativamente com a expressão da proteína. Lupi *et al.* (2007) também não encontrou relação com gênero e idade nos 500 casos de CPT avaliados, mas houve grande associação com invasão extratireoidiana, multicanalidade, metástases linfonodais, tumores de maior tamanho e, principalmente, com tumores não encapsulados. Como os tumores encapsulados têm melhor prognóstico, já que a recorrência é mais comum em neoplasias invasivas não encapsuladas do que nas encapsuladas (KAKUDO *et al.*, 2004), concluiu-se que o BRAF^{V600E} é associado à pior evolução da neoplasia papilífera.

Corroborando os achados acerca da associação positiva entre BRAF^{V600E} e pior prognóstico, Xing *et al.* (2005) verificou que a proteína BRAF^{V600E} tem sua prevalência

aumentada de forma proporcional à agressividade das variantes. Sendo a variante de células alta a que possui pior prognóstico e mais taxas de BRAF^{V600E}, seguida do CPT clássico e, após, a variante folicular. Essa evidência relaciona fortemente o oncogene à maior agressividade, ou seja, à maior extensão extratireoidiana, metástases linfonodais, tumores em estágio III e IV e à recorrência. Esse mesmo autor sugere que as discordâncias acerca do assunto podem ocorrer devido ao fato de que muitos estudos avaliaram pequenas amostras, nas quais prevaleciam subtipos com pouca expressão da proteína, como é o caso da variante folicular. Trovisco *et al.* (2005), também relacionou a expressão desse gene a um pior prognóstico, porém, conclui que essa associação deve-se ao fato desse ser expresso em pacientes com características clínicas que já compõem um carcinoma de alto risco, como idade avançada e tipo histológico naturalmente agressivo, sugerindo que essa evolução ruim deve-se ao fato de ele ser expresso em neoplasias já agressivas “por si só”. Os autores também verificaram menores taxas de multifocalidade do tumor nos casos de BRAF^{V600E} positivo.

Em contraste com os estudos citados, Lin *et al.* (2016), avaliou 78 CPT clássicos e nenhuma relação significativa foi observada entre a expressão positiva ou negativa do gene e o perfil do paciente, extensão do tumor, multicanalidade, metástases e estágio clínico. No mesmo ano, Zhang *et al.*, constatou a presença de BRAF^{V600E} em 88,3% dos 120 CPT avaliados e nenhuma incidência do mesmo em tumores benignos. Não houve relação entre as amostras com BRAF^{V600E} positiva e idade, gênero, tamanho do tumor e metástases em linfonodos, portanto, segundo tais autores, o gene não pode ser usado para prever o comportamento da neoplasia, mas é parte do desenvolvimento da mesma.

Em relação aos microcarcinomas papilíferos de tireoide (MCPT), um estudo realizado em 2015, por Lu *et al.* evidenciou que a mutação BRAF^{V600E}, presente em 54,6% deles, foi associada a fatores que predizem pior prognóstico, como invasão capsular e tamanho maior do que 5mm.

Quanto aos mecanismos pelos quais o gene atua, Xing *et al.* (2007) verificou que a proteína, além de estimular uma via de sinalização celular, também silencia vias de supressão tumoral, estimula fatores de angiogênese e diminui a afinidade do radioiodo pelo CPT, o que foi relacionado à invasão extratireoidiana e a tumores avançados, em estágio 3 e 4, fatores que aumentam as chances de mortalidade pelo tumor. Segundo Riesco-Eizaguirre *et al.* (2006), a associação com invasão fora da glândula, estágios avançados e recorrência do tumor existe, assim como há maior frequência da mutação na variante células altas e em neoplasias menos diferenciadas. Porém, não houve relação com idade, gênero e metástases no período do diagnóstico. Esse mesmo trabalho demonstrou que 62% dos CPT refratários à radioiodoterapia

possuíam BRAF^{V600E}. Esse dado condiz com o fato de que os CPT com o oncogene possuem menor expressão da proteína que realiza o simporte de sódio-iodeto (SSI) para as células foliculares, assim como menor expressão de tireoperoxidase, receptores de TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*), pendrina e tireoglobulina, necessários para a entrada de iodo na tireoide. Oler e Cerutti (2009) e Lin *et al.* (2016) também identificaram redução da expressão de SSI em tecidos neoplásicos que possuíam o oncogene em questão. Sugere-se, portanto, que o BRAF^{V600E} também prediz refratariedade à radioiodoterapia.

A PAAF também foi um método usado para avaliar essa relação. Xing *et al.* (2009) testaram a mutação BRAF^{V600E} em aspirados de CPT no pré-operatório e verificaram a existência de relação entre a positividade do teste e maior agressividade da neoplasia, propondo que a expressão dessa proteína pode auxiliar na decisão da extensão cirúrgica. De acordo com as recomendações atuais da American Thyroid Association, a presença da expressão de BRAF^{V600E} não deve alterar o tratamento dos pacientes, porém, juntamente com outras características clínicas, auxilia a prever o prognóstico dos mesmos.

Com o intuito de esclarecer as discordâncias acerca do assunto, Liu, Tianwen e Zeming (2016) realizam uma metanálise avaliando as literaturas publicadas entre 2003 e 2015. Os resultados apontaram para uma relação entre a presença do gene BRAF^{V600E} e características clínicas mais agressivas, dentre elas, invasão extratireoidiana, estágios avançados no TNM, metástases linfonodais e recorrência. Apenas não houve relação com metástases à distância. A análise sistemática realizada por Zhang *et al.* (2016)^A, encontrou resultados semelhantes, encontrando apenas casos raros de metástases a distância e relacionando a Tireoidite de Hashimoto (TH) ao BRAF^{V600E} de forma negativa, sendo a doença considerada protetora para essa mutação, mesmo sabendo-se que existem evidências de que a TH pode favorecer a instalação do CPT, uma vez que a inflamação por ela causada danifica o núcleo da célula folicular. A relação com gênero também foi positiva, sendo o feminino menos acometido por essa mutação. De acordo com os estudos, pode-se, portanto, usar a expressão de BRAF^{V600E} para avaliar o risco do paciente e, se necessário, optar por uma estratégia terapêutica mais agressiva para essas neoplasias.

É essencial salientar que o método usado para detecção pode interferir nos resultados, os quais podem ser diferentes para um mesmo paciente, dependendo da sensibilidade e especificidade do mesmo. Kowalik *et al.* (2017), compararam a eficácia de três métodos de detecção da mutação BRAF^{V600E}: Sequenciamento de DNA (Sanguer), PCR de amplificação específica de alelos (ASA-PCR) e PCR quantitativa (PCRq), sendo o último o que mostrou maiores taxas de detecção. Nos estudos de Elmageed *et al.* (2016), a detecção por IHQ mostrou-

se uma excelente alternativa, devido aos seus resultados serem muito semelhantes àqueles por sequenciamento de DNA e por PCR, uma vez que possui 98% de sensibilidade e 97% de especificidade. Segundo os autores, entre as vantagens da IHQ, estão menor custo e fácil implantação da técnica em centros menores, pois não há complexidade na interpretação do exame, como é o caso do PCR, além de não necessitar de extração de DNA, o que é importante quando avalia-se lesões pequenas e a aspirado da PAAF.

Se comprovada a associação entre a expressão da proteína BRAF^{V600E} e a pior evolução do carcinoma papilífero de tireoide, métodos como a IHQ podem ser usados na rotina diagnóstica futuramente, auxiliando no estadiamento da neoplasia para melhor manejo dos pacientes.

2.1.8. METODOLOGIA

2.1.8.1. Tipo de estudo

É um estudo quantitativo observacional do tipo transversal descritivo analítico.

2.1.8.2. Local e período de realização

O estudo será realizado em um laboratório da região norte do Rio Grande do Sul, entre Agosto de 2018 e Julho de 2019.

2.1.8.3. População e amostragem

A população do estudo será constituída de pacientes com carcinoma papilífero de tireoide. A amostra, não probabilística, de conveniência, incluirá pacientes submetidos à ressecção parcial ou total da glândula, entre 1 janeiro de 2016 e 31 de dezembro de 2017. Estima-se a utilização de, aproximadamente, 100 amostras.

Crítérios de inclusão: Ambos os sexos, qualquer idade, submetidos ao procedimento referido no período delimitado, cujas amostras de tecido tumoral estejam armazenadas em biobanco no laboratório citado.

Crítérios de exclusão: Pacientes com microcarcinomas papilíferos (tumores até 1 cm).

2.1.8.4. Variáveis e instrumentos de coleta de dados

Variável dependente: Presença ou ausência de diagnóstico de Carcinoma papilífero de tireoide.

Variáveis independentes: Idade, sexo, subtipo do carcinoma, tamanho da lesão primária, multifocalidade, presença ou não extensão extratireoidiana, invasão vascular ou linfática e metástases linfonodais.

Instrumentos de coleta de dados: Será realizada a partir da base de dados de pesquisa do laboratório citado, cujas amostras dos pacientes serão identificadas por números de registro. Os dados coletados do programa serão transcritos para um planilha (apêndice A) e posteriormente armazenados em uma planilha eletrônica, observando-se os critérios de inclusão e exclusão.

2.1.8.5. Logística

Quando a coleta de dados e a seleção das amostras inclusas no estudo forem concluídas, será realizado o estudo imunohistoquímico para avaliação da expressão da proteína do BRAF^{V600E} com anticorpo monoclonal RM8 Rmab Biosb 0,1 mL. Para tanto serão utilizados cortes de 4 micra de tecido tumoral parafinado com anticorpo de revelação com cromógeno vermelho e contra coloração com Hematoxilina de Haris. O laboratório onde será realizada a imunohistoquímica localiza-se dentro do Instituto de Patologia de Passo Fundo, onde estão as amostras de tecido tumoral do biobanco. A imunohistoquímica será realizada pela técnica em química do laboratório, a qual já realiza os procedimentos de rotina do local. E quem analisará e interpretará as lâminas de imunohistoquímica será a médica especialista em patologia do laboratório, pesquisadora principal do presente estudo. A técnica em química não precisará de remuneração para tal, devido ao fato de que o tempo destinado para a realização do procedimento em questão será o tempo excedente das atividades da mesma, dentro de sua carga horária padrão, não prejudicando de nenhuma maneira a realização das imunohistoquímicas de rotina do laboratório destinadas à diagnóstico de pacientes. Serão avaliados os casos quanto a positividade ou não da expressão da proteína. Nos casos positivos, será avaliada a intensidade da reação e a porcentagem de células tumorais positivas.

2.1.8.6. Processamento, controle de qualidade e análise dos dados

A dupla digitação de dados será feita em planilha eletrônica e as análises estatísticas serão feitas no PSPP (distribuição livre), compreendendo distribuição de frequências absoluta e relativa e teste de qui-quadrado de Pearson, considerando-se nível de significância estatística de 95%.

2.1.8.7. Aspectos éticos

Este estudo será realizado de acordo com a Resolução n°466/2012 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP). Será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por meio do sistema eletrônico Plataforma Brasil. Para tanto, será solicitada Ciência e Concordância da instituição onde será realizada a coleta dos dados e a seleção das amostras (Apêndice B). Considerando-se que serão utilizados dados cadastrais e amostras biológicas armazenadas em biobanco de pacientes atendidos em período anterior a realização do estudo, sem qualquer intervenção direta nestes pacientes e que os mesmos não mantêm atendimento regular na instituição, dificultando

o contato com a equipe de pesquisa, solicita-se dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Portanto, nos apêndices, encontra-se o Termo de Dispensa de TCLE (apêndice C). Além deste, também será assinado o Termo de Compromisso para uso de dados em arquivo (Apêndice D). Segundo a PORTARIA N° 2.201, publicada pelo Ministério da Saúde, em 14 de setembro de 2011, que estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa, conclui-se que o biobanco utilizado para a realização da pesquisa em questão está de acordo com as normativas estabelecidas. As normativas relacionadas ao presente estudo estabelecem que o biobanco deve adotar medidas de prevenção que minimizem os riscos inerentes às atividades de pesquisa (Art.10), sendo impedido de utilizar seus materiais para uso comercial (Art. 12) ou para realização de pesquisas que não tragam benefícios à sociedade (Art.13). Além de atentar e seguir as normativas citadas, o estudo em questão respeita o fato de que as amostras de biobanco devem ser utilizadas primeiramente para fins de assistência à saúde e apenas o material excedente será destinado à pesquisa (Art. 14). Por fim, e de acordo com o Art. 15, os materiais do biobanco somente serão utilizados para o estudo após o mesmo ter sido devidamente aprovado pelo CEP. O biobanco em questão está devidamente credenciado e funciona de acordo com as normas do CEP/CONEP, sendo de responsabilidade da instituição participante, a qual é uma sociedade simples limitada, em termos de natureza jurídica.

Riscos: Existe o risco de identificação do paciente. Entretanto, visando minimizar esse risco, os nomes serão substituídos por números no momento da extração dos dados do sistema. Caso a identificação ocorra, o estudo será interrompido.

Benefícios: Devido à natureza do estudo, não existem benefícios diretos para os participantes. No entanto, os mesmos serão beneficiados de forma indireta, assim como toda a comunidade, uma vez que a identificação da proteína presente nos casos de câncer de tireoide, bem como fatores associados, poderá contribuir com o tratamento de futuros pacientes acometidos, pois esse será realizado de forma mais específica, o que aumenta o tempo de sobrevivência e as chances de cura. O estudo, ao ser finalizado, será disponibilizado à instituição participante, via e-mail ou impresso, como for preferido, para que a mesma tenha conhecimento dos resultados obtidos. Portanto, a partir da análise dos dados, o estudo possibilitará que os pesquisadores e a instituição estendam seus conhecimentos acerca do tema em questão, com o intuito de melhorar o processo de diagnóstico e de prognóstico dos pacientes, o que beneficia a todos, mesmo que indiretamente.

2.1.9. RECURSOS

Os custos serão totalmente arcados pela equipe de pesquisa responsável pelo presente estudo.

ESPECIFICAÇÃO	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO (R\$)	TOTAL
1 DISPONÍVEL NO LABORATÓRIO			
Micrótomo	2	19.000,00	38.000,00
Processador automático de tecidos	1	185.000,00	185.000,00
Estufa para processamento (parafina, cortes)	1	3.200,00	3.200,00
Estufa IHQ	1	1.280,00	1.280,00
Panela vapor	1	180,00	180,00
Banho-maria (IHQ)	1	1.739,10	1739,10
Banho-maria (histológico)	1	399,00	399,00
Geladeira	1	598,00	598,00
Câmara úmida (IHQ)	4	99,00	396,00
Microscópio óptico	3	15.000,00	45.000,00
Computador	2	1.900,00	3.800,00
Impressora	1	1.100,00	1.100,00
Pipetador de 1000 μ L	1	129,00	129,00
Pipetador de 100 μ L	2	118,00	236,00
Pipetador de 50 μ L	1	115,00	115,00
SUBTOTAL		229.857,10	281.172,10
1.2 MATERIAL DE CONSUMO			
Solução de recuperação antigênica-Dako (500 ml)	1	933,30	933,30
Caneta Easy Path	1	400,00	400,00
Kit DAB-Dako (110 ml)	1	520,00	520,00
Anticorpo monoclonal RM8 Rmab Biosb 0,1 mL	1	R\$ 4.014,00	4.014,00
Silano (500 ml)	1	263,93	263,93

Lâminas histológicas	100	15,00	1500,00
Lamínulas (caixas com 100)	15	63,00	945,00
Ponteiras (pacote com 1000 para 100µL)	8	49,00	392,00
Ponteiras (pacote com 1000 para 1000 µL)	1	100,00	100,00
PBS (ampola mistura para 1000 ml)	1	100,00	100,00
Formol (bombona 40L)	1	58,00	58,00
Álcool 99% (bombona 5L)	25	16,00	400,00
Xilol (frasco 1000 ml)	20	12,50	250,00
Parafina (pacote com 2kg)	20	14,00	280,00
Acentona P.A (frasco com 1000 ml)	8	38,00	304,00
Cassetes (pacote com 100 unidades)	5	63,00	315,00
SUBTOTAL		R\$ 4.415,50	R\$10.775,23
TOTAL			R\$ 291.947,33

2.1.10 CRONOGRAMA

Este cronograma será executado somente após aprovação do projeto pelo Sistema CEP/CONEP.

ATIVIDADES	2017-2019											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA								17	17	17	17	17
			18	18	18	18						
LEVANTAMENTO DE DADOS DO LABORATÓRIO								18	18	18	18	
ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO								18	18	18	18	18
ENVIO DE RELATÓRIO PARCIAL		19										
ANÁLISE ESTATÍSTICA			19	19	19							
ENVIO DE RELATÓRIO FINAL						19						
ELABORAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO				19	19	19						
APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO							19					

2.1.11 REFERÊNCIAS

- COHEN, Y et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. **Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], v. 95, n. 8, p.625-627, 2003.
- DAVIES, Helen et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p.949-954, jun. 2002.
- DAVIES, Louise; WELCH, H. Gilbert. Current Thyroid Cancer Trends in the United States. **Jama Otolaryngology–head & Neck Surgery**, [s.l.], v. 140, n. 4, p.317-322, abr. 2014.
- DAVIES, Louise; WELCH, H. Gilbert. Thyroid Cancer Survival in the United States. **Archives Of Otolaryngology–head & Neck Surgery**, [s.l.], v. 136, n. 5, p.440-444, maio 2010.
- ELMAGEED, Zakaria Y. Abd et al. Immunohistochemistry as an accurate tool for evaluating BRAF-V600E mutation in 130 samples of papillary thyroid cancer. **Surgery**, [s.l.], v. 161, n. 4, p.1122-1128, abr. 2017.
- ESTADOS UNIDOS. NATIONAL CANCER INSTITUTE. . **Thyroid Cancer Treatment: Health Professional Version**. 2017. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/thyroid/hp/thyroid-treatment-pdq>. Acesso em: 20 set. 2017.
- FAGIN, James A.; WELLS, Samuel A.. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 375, n. 11, p.1054-1067, 15 set. 2016.
- FRASER, S. et al. BRAFV600E Mutation is Associated with Decreased Disease-Free Survival in Papillary Thyroid Cancer. **World Journal Of Surgery**, [s.l.], v. 40, n. 7, p.1618-1624, 2 maio 2016.
- HAUGEN, Bryan R. et al. American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.1-133, jan. 2016.
- HAYES, D.F et al. Tumor marker utility grading system: A framework to evaluate clinical utility of tumor markers. **Journal of the National Cancer Institute**. Boston, v. 88, ed. 20, p. 1456-66, 1996.
- JIANG, L; CHU, H; ZHENG, H. B-Raf mutation and papillary thyroid carcinoma patients. **Oncology Letters**. v. 11, ed. 4, p. 2699-2705, 2016.
- KAKUDO, K. Papillary carcinoma of the thyroid in Japan: subclassification of common type and identification of low risk group. **Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 57, n. 10, p.1041-1046, 1 out. 2004.
- KOWALIK, A. et al. Evaluation of molecular diagnostic approaches for the detection of BRAF p.V600E mutations in papillary thyroid cancer: Clinical implications. **PLoS One**. V. 12, ed. 6, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479585/>.
- LENNARD, Colleen M. et al. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. **Surgery**, [s.l.], v. 129, n. 5, p.552-558, maio 2001.

- LIN, Jiunn-diann et al. Clinical Manifestations and Gene Expression in Patients with Conventional Papillary Thyroid Carcinoma Carrying the BRAFV600E Mutation and BRAF Pseudogene. **Thyroid**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.691-704, maio 2016.
- LIU, Chunping; CHEN, Tianwen; LIU, Zeming. Associations between BRAFV600E and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. **World Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-12, 6 set. 2016.
- LU, Hai-zhen et al. Association between BRAFV600E mutation and the clinicopathological features of solitary papillary thyroid microcarcinoma. **Oncology Letters**, [s.l.], p.1595-1600, 1 fev. 2017.
- LUPI, C et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, ed. 11, p. 4085–4090, 2007.
- NIKIFOROV, Yuri E. et al. Impact of Mutational Testing on the Diagnosis and Management of Patients with Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: A Prospective Analysis of 1056 FNA Samples. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 96, n. 11, p.3390-3397, nov. 2011.
- NIKIFOROV, Yuri E.; NIKIFOROVA, Marina N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.569-580, 30 ago. 2011.
- NIKIFOROVA, Marina N; NIKIFOROV, Yuri e. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.83-95, jan. 2008.
- NISHIDA, T; NAKAO, K; HAMAJI M et al. Overexpression of p53 protein and DNA content are important biologic prognostic factors for thyroid cancer. **Surgery**, v. 119, ed. 5, p. 568-575, 1996.
- OLER, Gisele; CERUTTI, Janete M. High prevalence of BRAFmutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas. **Cancer**, [s.l.], v. 115, n. 5, p.972-980, 1 mar. 2009.
- RABES H. et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. **Clinical Cancer Research**.v. 6, ed. 1, p. 93-103, 2000.
- RIESCO-EIZAGUIRRE, G. et al. 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. **Endocrine – related cancer**, v. 13, ed. 1, p. 257-69, 2006.
- RIO DE JANEIRO. INCA. Brasil. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acesso em: 20 set. 2017.
- SANDERS, L.E; CADY, B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. **Archives of Surgery**. v. 133, ed. 4, p. 419-425, 1998.
- SHIMAMURA, Mika et al. Postnatal Expression of BRAFV600E Does Not Induce Thyroid Cancer in Mouse Models of Thyroid Papillary Carcinoma. **Endocrinology**, [s.l.], v. 154, n. 11, p.4423-4430, nov. 2013.

TANG, Kam-tsun; LEE, Chen-hsen. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. **Journal Of The Chinese Medical Association**, [s.l.], v. 73, n. 3, p.113-128, mar. 2010.

TROVISCO, V. et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. **Virchows. Arch: an international journal of pathology**. v. 446, p. 589–95, 2005.

VIGNERI, R; MALANDRINO, P; VIGNERI, P. The changing epidemiology of thyroid cancer: why is incidence increasing? **Current Opinion In Oncology Journal**. v. 27, ed. 1, p. 1-7, 2015.

XING, M. et al. BRAF Mutation Predicts a Poorer Clinical Prognosis for Papillary Thyroid Cancer. **The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism**. v. 90, ed. 12, p. 6373-9, dez. 2005.

XING, M. BRAF mutation in thyroid cancer. **Endocrine-Related Cancer**. Baltimore, v. 12, ed. 2, p. 245-62, 2005.

YANG, X. et al. Postoperative Stimulated Thyroglobulin Level and Recurrence Risk Stratification in Differentiated Thyroid Cancer. **Chinese Medical Journal**. v. 128, ed.8, p. 1058–1064, 2015.

ZHANG, Q^A et al. Meta-Analyses of Association Between BRAFV600E Mutation and Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Carcinoma. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, p. 763-776, 2016.

ZHANG, B^B et al. Diagnostic significance of the BRAFV600E mutation in conventional papillary thyroid carcinomas. **International Journal of Clinical And Experimental Medicineis**, v. 9, ed. 5, p. 8296-8303, 2016.

2.1.12 APÊNDICES

APÊNDICE A – Planilha de Transcrição

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIROIDE

NOME DO COLETOR DOS DADOS:	
Nº DO REGISTRO:	
IDADE: () ≤ 45 anos () ≥ 45 anos	SEXO: () FEMINNO () MASCULINO
SUBTIPO: () CLÁSSICO () FOLICULAR () SÓLIDA () ONCOCÍTICA () CÉLULAS ALTAS () COLUNAR () CÉLULAS CLARAS () ESCLEROSANTE DIFUSA	
TAMANHO DA LESÃO PRIMÁRIA: () ≤ 2 cm () ≥ 2 cm	
MULTIFOCALIDADE: () PRESENTE () AUSENTE	
EXTENSÃO EXTRATIREOIDIANA: () PRESENTE () AUSENTE	
INVASÃO VASCULAR OU LINFÁTICA: () VASCULAR () LINFÁTICA () AUSENTE	
METÁSTASES LINFONODAIS: () PRESENTE () AUSENTE	

APÊNDICE B – Termo de autorização para uso de dados do biobanco do Instituto de Patologia de Passo Fundo (SOCIEDADE SIMPLES LIMITADA).

O presente termo tem por objetivo a autorização para a utilização de dados do biobanco (tecido emblocado em parafina e cortes de tecido parafinado em lâminas coradas em Hematoxilina-Eosina) e ficha cadastral dos pacientes, provenientes do INSTITUTO DE PATOLOGIA DE PASSO FUNDO – RS, para uso no trabalho de conclusão de curso (TCC) intitulado como “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE” da faculdade de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul campus Passo Fundo – RS. O projeto será realizado pela acadêmica Luiza Rosso da Silva, sob orientação da Prof^a Josiane Borges Stolfo. Segundo a PORTARIA Nº 2.201, publicada pelo Ministério da Saúde, em 14 de setembro de 2011, que estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa, conclui-se que o biobanco utilizado para a realização da pesquisa em questão está de acordo com as normativas estabelecidas. As normativas relacionadas ao presente estudo estabelecem que o biobanco deve adotar medidas de prevenção que minimizem os riscos inerentes às atividades de pesquisa (Art.10), sendo impedido de utilizar seus materiais para uso comercial (Art. 12) ou para realização de pesquisas que não tragam benefícios à sociedade (Art.13). Além de atentar e seguir as normativas citadas, o estudo em questão respeita o fato de que as amostras de biobanco devem ser utilizadas primeiramente para fins de assistência à saúde e apenas o material excedente será destinado à pesquisa (Art. 14). Por fim, e de acordo com o Art. 15, os materiais do biobanco somente serão utilizados para o estudo após o mesmo ter sido devidamente aprovado pelo CEP. O biobanco em questão está devidamente credenciado e funciona de acordo com as normas do CEP/CONEP, sendo de responsabilidade da Dr^a Josiane Borges Stolfo.

Passo Fundo, junho de 2018

Instituto de Patologia de Passo Fundo – RS
Josiane Borges Stolfo – Responsável Técnica
CRM 24911

Pesquisador Responsável
Josiane Borges Stolfo

APÊNDICE C – Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA

AValiação DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAF^{V600E} EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

Esta pesquisa será desenvolvida por Luiza Rosso da Silva, discente de Graduação em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Passo Fundo, sob orientação da Prof^a Me. Josiane Borges Stolfo.

O objetivo central do estudo é avaliar a expressão da proteína BRAF^{V600E} em carcinomas papilíferos de tireoide e relacionar com dados clínico-patológicos. Esta pesquisa é justificada pelo fato de o carcinoma papilífero de tireoide ser o tipo histológico mais comum de carcinoma de tireoide, representando de 60 a 80% dos casos, segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. A incidência dessa neoplasia é alta e compõe cerca de 5% dos cânceres femininos, sexo mais acometido pela doença. Atualmente, estima-se que um em cada mil indivíduos será acometido durante sua vida e, apesar do número de casos ser alto, aproximadamente 7 mil casos no Brasil, no ano de 2016, as taxas ainda estão crescendo, tanto pela melhora nas técnicas diagnósticas, quanto por um aumento verdadeiro no número de acometimentos. O CPT é, de modo geral, uma neoplasia indolente e apresenta taxas de sobrevida de 90% em 10 anos. Entretanto, como ocorre também em outros tipos de câncer, essa neoplasia possui variantes agressivas, relacionadas a um pior prognóstico para o paciente. Portanto, considerando a alta prevalência dessa neoplasia, é necessário que haja recursos disponíveis para que seja avaliado, de forma segura e precoce, o perfil da neoplasia do paciente, o que resulta em condutas médicas mais eficazes. Relacionando a presença da proteína BRAF^{V600E} à evolução da neoplasia, torna-se possível melhorar a acurácia do prognóstico no momento do diagnóstico, possibilitando iniciar um tratamento mais agressivo antecipadamente, definir mais precisamente a extensão cirúrgica e como será o acompanhamento do paciente durante e depois da doença, reduzindo as chances de que o tumor recorra ou torne-se resistente à terapia posteriormente.

Serão incluídos no estudo pacientes com carcinoma papilífero de tireoide. A amostra, não probabilística, de conveniência, incluirá pacientes submetidos à ressecção parcial ou total da glândula, entre 1 janeiro de 2016 e 31 de dezembro de 2017. Pacientes com microcarcinomas papilíferos (tumores até 1 cm) serão excluídos do estudo. A coleta dos dados será realizada a partir da base de dados de um laboratório da região norte do Rio Grande do Sul e as variáveis analisadas serão: idade, sexo, subtipo do carcinoma, tamanho da lesão primária, multifocalidade, presença ou não extensão extratireoidiana, invasão vascular ou linfática e metástases linfonodais.

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações obtidas, uma vez que, na rotina laboratorial, as amostras dos pacientes são identificadas com um número de registro, sendo o nome sempre poupado, o que garante o anonimato. Caso haja identificação do sujeito, o estudo será interrompido. Existe o risco de identificação do paciente, entretanto, esse será minimizado, pois o paciente será identificado por um número de registro desde o momento da coleta dos dados. Devido à natureza do estudo, não existem benefícios diretos para o participante. No entanto, a comunidade poderá ser beneficiada de forma indireta, uma vez que, a identificação da proteína presente nos casos de câncer de tireoide, bem como fatores associados, poderá contribuir com o tratamento de futuros pacientes acometidos, pois esse será realizado de forma mais específica, o que aumentará as chances de cura.

Este estudo será realizado de acordo com a Resolução nº466/2012 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP). Será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por meio do sistema eletrônico Plataforma Brasil. Para tanto, será solicitada Ciência e Concordância da instituição onde será realizada a coleta dos dados e a seleção das amostras. Considerando-se que serão utilizados dados cadastrais e amostras biológicas armazenadas em biobanco de pacientes atendidos em período anterior a realização do estudo, que esses não sofrerão intervenção direta e que os mesmos não mantêm atendimento regular na instituição, dificultando o contato com a equipe de pesquisa, solicita-se dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Passo Fundo, dezembro de 2017.

Nome completo e legível do pesquisador responsável:

APÊNDICE D – Termo de compromisso para uso de dados

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS
PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

O(s) pesquisador(es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

- I. Preservar a identidade dos pacientes cujos dados serão coletados;
- II. Assegurar que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- III. Assegurar que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo utilizadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

Assinatura do Pesquisador Responsável

Passo Fundo, dezembro de 2017

2.2 RELATÓRIO

2.2.1 APRESENTAÇÃO

O relatório tem como objetivo detalhar o projeto de pesquisa “Avaliação da expressão da proteína BRAFV600E em carcinomas papilíferos de tireoide” para elucidar como se desenvolveu o trabalho e quais alterações foram realizadas no decorrer do mesmo.

2.2.2 DESENVOLVIMENTO

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no segundo semestre de 2017 e submetido para avaliação e aprovação do Instituto de Patologia de Passo Fundo (IPPF), o qual emitiu um Termo de Ciência e Concordância. Em seguida, no dia 27/02/2018, foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da UFFS (Anexo A), retornando com pendências no dia 06/04/2018. As principais pendências foram em relação à logística do estudo e à realização da imuno-histoquímica e foram solicitadas informações adicionais sobre o laboratório de patologia, onde o trabalho seria realizado. Foi submetido novamente em 26/04/2018 e nova pendência emitida em 16/05/2018. O último envio ocorreu no dia 13/06/2018, quando foi emitida aprovação (22/06/2018), descrita no Anexo B.

2.2.2.1 LOGÍSTICA E COLETA DE DADOS

Na primeira semana de julho/2018, a planilha de transcrição foi impressa, com cerca de 100 cópias, e a coleta de dados iniciou-se em 19/07/2018, quando os casos de carcinoma papilífero de tireoide foram selecionados. A seleção foi realizada a partir do banco de dados do laboratório de patologia, pela busca do termo “carcinoma papilífero de tireoide”, filtrando os resultados para as datas de 01/01/2016 e 31/12/2017. Os casos de microcarcinomas papilíferos (< 1cm) foram excluídos. Durante a análise dos resultados, 54 casos de carcinomas papilíferos de tireoide foram identificados e tiveram seus números de identificação transcritos para a planilha, de modo a ocultar as informações pessoais do paciente. Após, foi localizado o laudo histopatológico de cada um, onde estão as informações necessárias para o preenchimento das características clinico-patológicas dos tumores. Durante a revisão dos laudos, ainda foram verificados 4 microcarcinomas, os quais foram excluídos do estudo. Portanto, 50 casos tiveram suas características transcritas para a planilha de transcrição para serem incluídos no estudo. A planilha foi modificada durante a coleta, de acordo com as informações encontradas nos laudos (Apêndice 1), sendo acrescentado o tipo de tireoidectomia, a lateralidade do tumor e a presença de patologias encontradas na glândula (tireoidite e bócio multinodular), pois foi notada

frequência elevada dessas condições e considerou-se necessário descrevê-las. Além disso, a nomenclatura “subtipo” foi corrigida para “variante”, uma vez que trata-se das diferentes apresentações do subtipo papilífero. As demais variantes citadas na planilha foram agrupadas como “outras”, devido ao pequeno número de casos. Também foi acrescentado a expressão de BRAFV600E, com intensidade e porcentagem celular de expressão.

2.2.2.2 PERDAS E RECUSAS

No projeto inicial havia sido prevista amostra de 100 casos, no entanto, utilizando-se os critérios de inclusão, foram contabilizados 50. De modo a aumentar o grupo amostral, poderia-se sugerir a coleta em um período maior, abrangendo pacientes desde 2015. Porém, a principal variável a ser estudada (expressão da proteína BRAFV600E nas células tumorais) depende da realização de estudo imuno-histoquímico, o qual é realizado com um anticorpo que estava disponível em um volume suficiente apenas para a amostra coletada.

No decorrer do segundo semestre de 2018, os dados foram transcritos para planilha eletrônica e a caracterização da amostra foi realizada. Com isso, foi notada prevalência expressiva de CPT clássicos e essa variável foi retirada da análise estatística para que não causasse confusão na interpretação dos dados. Essa informação não interfere na relevância do trabalho, uma vez que a relação entre a variante e a presença da mutação já está definida pela literatura. Portanto, os dados relacionados ao subtipo, tipo de tireoidectomia e doenças associadas presentes no laudo foram apenas descritos e não analisados estatisticamente.

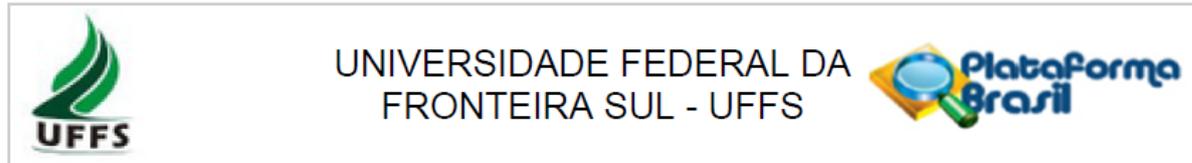
A IHQ, que seria realizada também no segundo semestre de 2018, foi adiada para os meses seguintes, para que não interferir na rotina de trabalho do laboratório, visto que os procedimentos do estudo necessitaram de profissionais capacitados. Em abril de 2019, as lâminas do material a ser analisado para presença da proteína foram selecionadas, entretanto, apenas 39 dos 50 CPT possuíam amostras de tireoidectomia armazenadas no biobanco do laboratório. No mês de maio a IHQ foi finalizada. Após, as 39 amostras foram interpretadas no laboratório da instituição pela Prof. Josiane Borges, orientadora do presente estudo e médica patologista do IPPF.

O artigo elaborado a partir do projeto de pesquisa foi estruturado de acordo com as normas da revista a qual será submetido, o *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*.

2.2.3 CONCLUSÃO

A aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP ocorreu em junho de 2018 e durante o segundo semestre desse ano e o primeiro semestre de 2019, a coleta e análise de dados foram realizadas. Houve perda de 11 casos ao longo do estudo, por não atenderem aos critérios de inclusão, resultando em uma amostra de 39 CPT. A IHQ e a análise de dados foram realizadas sem intercorrências e foram muito importantes para ampliação dos conhecimentos acadêmicos e científicos dos pesquisadores.

ANEXO A – Comprovante de envio do projeto de pesquisa ao CEP.

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

Pesquisador: JOSIANE BORGES STOLFO

Versão: 3

CAAE: 84551418.2.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 018241/2018

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE que tem como pesquisador responsável JOSIANE BORGES STOLFO, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS em 07/03/2018 às 11:23.

ANEXO B – Parecer de aprovação pelo CEP.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

Pesquisador: JOSIANE BORGES STOLFO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84551418.2.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.731.524

Apresentação do Projeto:

Já apresentado no parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Já apresentado no parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já apresentado no parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora atendeu todas as pendências indicadas pelo CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora atendeu todas as pendências indicadas pelo CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há impedimentos éticos ao desenvolvimento do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa.

Continuação do Parecer: 2.731.524

Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFS apresenta alguns pontos no documento "Deveres do Pesquisador".

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.ufs@ufs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a "central de suporte" da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1064952.pdf	13/06/2018 20:53:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto de pesquisa modificada.pdf	13/06/2018 20:39:35	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Declaração de Manuseio Material	autorizacao obio bancomodificada.pdf	13/06/2018 20:38:31	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito

Continuação do Parecer: 2.731.524

Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacaoobiobancomodificada.pdf	13/06/2018 20:38:31	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Outros	cartaderespostaaspendencias1.pdf	13/06/2018 20:36:43	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Outros	naoiniciada.pdf	27/02/2018 16:35:30	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Outros	planilhadetranscricao.pdf	20/02/2018 14:05:48	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromisso.pdf	20/02/2018 13:50:14	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	solicitacaodedispensaluiza.pdf	20/02/2018 13:45:47	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_ass.pdf	20/02/2018 13:42:17	JOSIANE BORGES STOLFO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 22 de Junho de 2018

Assinado por:
Valéria Silvana Faganello Madureira
(Coordenador)

APÊNDICE 1 – Planilha de transcrição para coletas de dados modificada

PLANILHA DE TRANSCRIÇÃO PARA COLETA DE DADOS “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E”	
DATA:	
CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO:	
IDADE:	(1) < 45 anos (2) ≥ 45 anos
SEXO:	(1) FEMININO (2) MASCULINO
VARIANTE:	(1) CLÁSSICO (2) FOLICULAR (3) OUTROS
TAMANHO DA LESÃO PRIMÁRIA:	(1) < 2 cm (2) ≥ 2 cm
MULTIFOCALIDADE:	(1) PRESENTE (2) AUSENTE
EXTENSÃO EXTRATIREOIDIANA:	(1) PRESENTE (2) AUSENTE
INVASÃO VASCULAR OU LINFÁTICA:	(1) VASCULAR (2) LINFÁTICA (3) AUSENTE (4) VASCULAR E LINFÁTICA
METÁSTASES LINFONODAIS:	(1) PRESENTE (2) AUSENTE (3) NÃO AVALIADO
LOBO ACOMETIDO:	(1) UNILOBAR (2) MULTILÓBULO (3) NÃO AVALIADO
TIREOIDECTOMIA:	(1) TOTAL (2) PARCIAL
TIREOIDITE/BÓCIO ASSOCIADOS:	(1) PRESENTE (2) AUSENTE
PRESENÇA DA PROTEÍNA BRAFV600E:	(1) SIM (2) NÃO
INTENSIDADE:	(1) FORTE (2) MODERADA (3) FRACA
PORCENTAGEM DA EXPRESSÃO DE BRAFV600E:	(1) HIPEREXPRESSÃO (≥ 50 % DAS CÉLULAS) (2) EXPRESSÃO (< 50% DAS CÉLULAS)

3 ARTIGO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRAFV600E EM CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREOIDE

Luiza R. da Silva ¹, Josiane B. Stolfo ²

1. Discente do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul – Passo Fundo.
2. Médica Patologista pelo Instituto de Patologia de Passo Fundo, docente do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul – Passo Fundo, Mestre em Bioexperimentação pela Universidade de Passo Fundo.

RESUMO

Introdução: O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é o subtipo histológico mais comum de todas as neoplasias dessa glândula. Possui uma evolução indolente na maioria dos casos, entretanto, alguns ainda cursam com prognóstico reservado, de acordo com suas características clínico-patológicas. Entre elas, a expressão da proteína BRAFV600E está em estudo, devido ao seu possível valor no prognóstico dos pacientes. **Objetivos:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína BRAFV600E nos CPT e relacionar com as características clínico-patológicas. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados casos de CPT ≥ 1 cm de pacientes que possuíam amostras de tireoidectomia no biobanco do laboratório de patologia. Esses foram avaliados quanto à expressão da proteína BRAFV600E, pelo método imuno-histoquímico, e quanto às suas características clínico-patológicas. As variáveis descritas e relacionadas à expressão da proteína BRAFV600E foram a idade, sexo, lateralidade, tamanho, multifocalidade, extensão extratireoidiana, metástases linfonodais e invasão linfovascular. Intensidade e percentual de células com expressão também foram analisadas. **Resultados:** A prevalência da mutação BRAFV600E foi detectada em 26 (66,7%) dos 39 casos, sendo a maioria de intensidade moderada (12/26, 46%) e de expressão em $< 50\%$ das células tumorais (18/26, 70%). Não houve associação entre a expressão da proteína e as características clínico-patológicas do CPT. A intensidade e a porcentagem de células mutadas também não possuíram significância estatística. **Conclusão:** Foi encontrada grande prevalência da expressão da proteína BRAFV600E nos CPT, entretanto, no presente estudo, sua positividade não foi associada às características clínico-patológicas que predizem agressividade do tumor, não sendo possível afirmar que possua valor prognóstico.

Palavras-chave: Neoplasias da glândula tireoide. Carcinoma papilífero de tireoide. Proteínas proto-oncogênicas B-raf.

INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é a principal neoplasia endócrina, sendo a causa de 5-10% dos nódulos dessa glândula (1) e, com excessão do tipo histológico medular, é originado das células foliculares da tireoide. De acordo com dados de 2018, apresentados pela International Agency for Research on Cancer (IARC) e pelo Instituto Nacional do Câncer no Brasil (INCA), o CT é o décimo câncer mais frequente na população mundial e, considerando apenas o sexo feminino entre os 20 e 59 anos, a neoplasia ocupa o terceiro lugar no Brasil, atrás apenas dos cânceres de mama e de colo de útero (2,3). No país, estima-se que em 2019 serão documentados em torno de 1 caso a cada 100.000 homens e 7,5 casos a cada 100.000 mulheres.

O CT apresenta-se, em 50 - 85% dos casos (3,4), como carcinoma papilífero de tireoide. Os demais subtipos são menos comuns e com características biológicas distintas, sendo eles: folicular, oncocítico, medular, carcinoma pouco diferenciado e indiferenciado (5). O subtipo papilífero foi assim denominado por possuir arquitetura papilar, como visto na histologia da variante clássica, a mais prevalente dentre os CPT. Entretanto, hoje sabe-se que pode apresentar-se de outras formas, como nas variantes foliculares, células altas, colunares, hobnail (em tacha), trabecular e cribiforme (5). A suspeita diagnóstica é realizada através da história clínica do paciente e da ultrassonografia, e confirmada por meio da análise citopatológica proveniente da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e do exame histopatológico do espécime cirúrgico, que considera alterações celulares características do CPT, como o entalhe/fenda nuclear, núcleo opticamente vazio e a pseudoinclusão nuclear (5).

A sobrevida dos pacientes com CT é alta, chegando a 90% em 10 anos e sendo melhor em pacientes do sexo feminino, com menos de 45 anos e com tumores de menor tamanho (3,6,7). Entretanto, para aqueles com características desfavoráveis, como idade avançada e tumores biologicamente agressivos, a chance de recorrência após tireoidectomia e terapia com iodo radioativo é maior (6), chegando a 5 – 20% em alguns casos, além de que até 15% deles podem apresentar metástases à distância (7). Devido a esses desfechos, inúmeros estudos vem sendo publicados com o intuito de esclarecer quais características clínico-patológicas realmente influem na agressividade da neoplasia, uma vez que ainda existem dados controversos em relação a quais fatores devem ser considerados na avaliação prognóstica e na escolha terapêutica (8). Nesse contexto, os biomarcadores surgem como importante ferramenta, destacando-se, entre eles, o BRAFV600E.

O gene BRAF é um proto-oncogene que codifica a proteína B-raf, a qual, associada às enzimas Ras, MEK e ERK forma a cascata de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), uma das vias mais importantes de sinalização celular. A principal mutação desse gene é a V600E, provocada pela substituição de valina por ácido glutâmico na posição 600 da proteína, causando proliferação celular independente de estímulos extracelulares, o que pode ocasionar uma neoplasia, se somado a outras alterações genéticas e epigenéticas (9–11). A mutação BRAFV600E está presente em 43 – 88% dos CPT e os estudos tentam estabelecer se há relação entre a mesma e as características clínico-patológicas do CPT, principalmente àquelas associadas a pior evolução (12,13). Além disso, alguns autores também sugerem que a presença do gene BRAFV600E possa ter valor diagnóstico e influência no seguimento dos pacientes após tratamento (14,15).

OBJETIVOS:

Avaliar a expressão da proteína BRAFV600E pelo método imuno-histoquímico em carcinomas papilíferos de tireoide e relacionar com dados clínico-patológicos, como idade, sexo, tamanho, multifocalidade, extensão extratireoidiana, metástases linfonodais e invasão linfovascular.

MATERIAL E MÉTODOS:

Estudo transversal, realizado com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEP-UFFS), Rio Grande do Sul, Brasil, sob o número: 84551418.2.0000.5564.

A amostra foi composta pelos pacientes diagnosticados com carcinoma papilífero de tireoide entre 1º de janeiro de 2016 e 31 de dezembro de 2017 que possuíam amostras de tireoidectomia total ou parcial armazenadas no biobanco de um laboratório de patologia do norte do estado do RS. Foram excluídos os casos de microcarcinomas papilíferos (tumores < 1 cm). As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina para a realização de imuno-histoquímica (IHQ). Foram selecionados os blocos de parafina das secções de Hematoxilina e Eosina (H&E), previamente analisadas, em cortes de 3µm, sendo utilizado o anticorpo monoclonal RM8 Rmab Biosb 0,1 mL. As amostras foram incubadas “*overnight*” com o anticorpo diluído (1:150) em solução de Citrato pH 6,0, em temperatura ambiente, sendo amplificadas pelo método polímero, reveladas com cromógeno diaminobenzidina (DAB) e contracoradas com a Hematoxilina de Harris (HH).

A análise da detecção da proteína BRAF foi feita pela contagem das células tumorais (CT) com marcação citoplasmática. A porcentagem de CT positivas para a marcação de BRAFV600E foi realizada em campos microscópicos, em lâminas de 3 a 5 mm, com aumento de 400 X, sob microscopia óptica de luz. A contagem, sempre que possível, foi feita em três campos e somente a marcação citoplasmática das células tumorais foi considerada. A marcação de células estromais e inflamatórias foi desconsiderada. As amostras positivas para a expressão da proteína BRAFV600E foram divididas a partir do percentual das CT marcadas por IHQ, sendo considerada como expressão (até 50% das CT) ou hiperexpressão ($\geq 50\%$). Também foram categorizadas em relação à intensidade, de acordo com a objetiva na qual eram primeiramente visualizadas, podendo ser fraca (400x), moderada (100x) e forte (40x).

As variáveis clínico-patológicas analisadas, coletadas a partir da base de dados do laboratório, foram idade, sexo, lateralidade (lobo acometido), multifocalidade, presença de invasão linfovascular (ILV), extensão extratireoidiana (EET) e presença de metástases linfonodais (MTL). O subtipo do CPT, assim como a presença de tireoidite e/ou bócio multinodular, foram apenas descritas. A escolha das variáveis foi baseada no “Protocolo para exame de amostras de pacientes com carcinoma de tireóide”, publicado pelo Colégio Americano de Patologistas (5).

A análise estatística foi realizada com o pacote SPSS 2.0, avaliando-se as frequências absolutas e relativas das características clínico-patológicas do CPT. A relação entre essas e a expressão da proteína BRAFV600E foi calculada a partir do Teste de Fisher. O Teste de qui-quadrado de Pearson foi utilizado para relacionar as variáveis clínico-patológicas do tumor com a porcentagem de expressão e com sua intensidade. Valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS:

Foram selecionados 39 casos para o estudo. As características clínicas e patológicas dos mesmos são apresentadas na Tabela 1, sendo 38 das amostras provenientes de tireoidectomia total e apenas 1 de tireoidectomia parcial. A média de idade dos pacientes acometidos foi de 47 anos (mediana de 48 anos e DP $\pm 12,7$) e as idades mínima e máxima foram de 15 e 69 anos, respectivamente. Notou-se predomínio de pacientes do sexo feminino (89%) e de idade ≥ 45 anos (61%). Como esperado, a variante clássica foi encontrada na maioria das amostras (79,4%), sendo que em apenas 8 foram descritas outras variantes, principalmente a folicular (18%). A maioria das lesões possuía < 2 cm ao diagnóstico (59%), não eram multifocais (61%) e não apresentavam extensão extratireoidiana (51%). Um total de 67% dos casos estavam

confinados a apenas um lobo ou ao istmo. Em 46% dos casos foram documentadas invasão vascular e/ou linfática, sendo a linfática presente em 83% dos mesmos. Linfadenectomia para avaliação de metástases foi realizada em 26 das amostras e em 8 (30%) foi constatada metástase linfonodal. Havia evidência de tireoidite e/ou bócio multinodular em 61,5%.

Entre os 39 casos de CPT avaliados, 26 (66,7%) expressavam a proteína BRAFV600E (Figura 1). Esses resultados foram relacionados com as características do tumor, como sumarizado na Tabela 2.

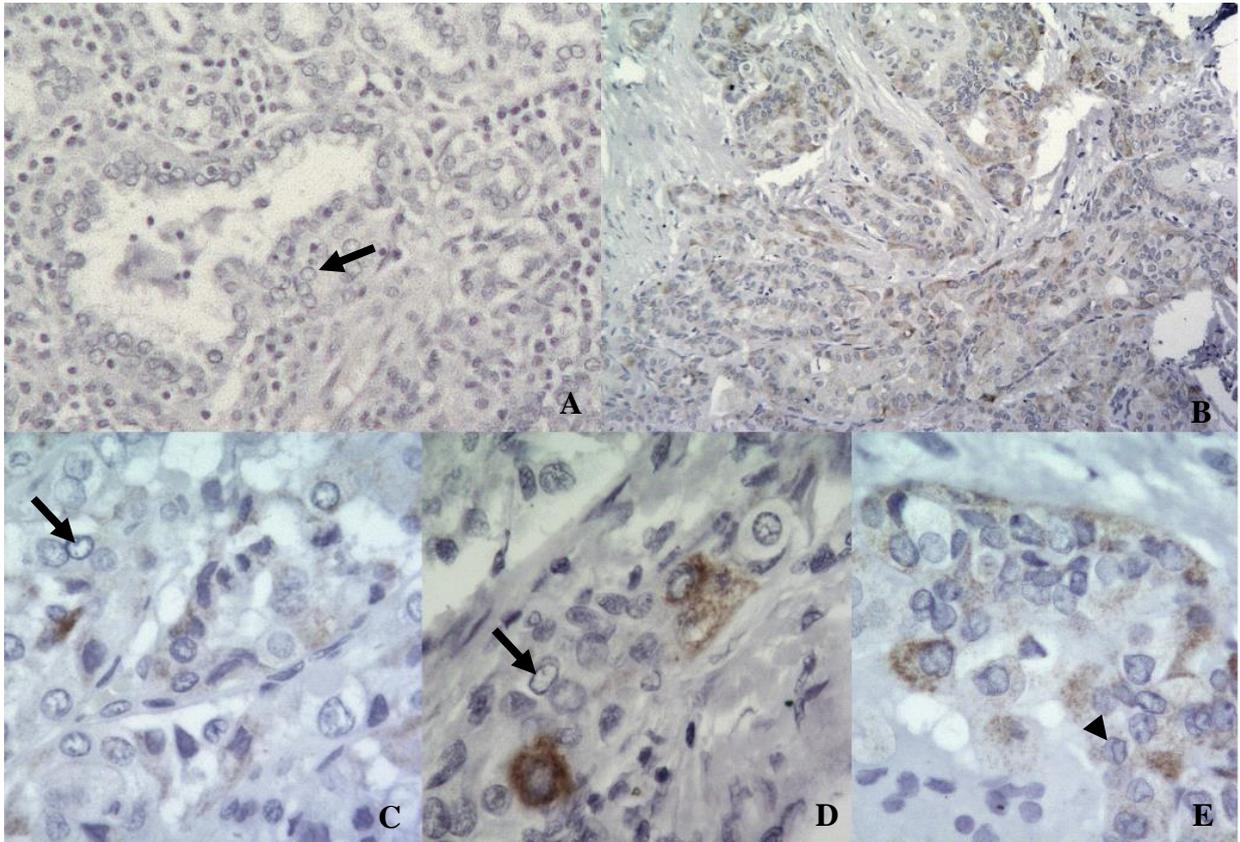


FIGURA 1. Arquivo próprio. As fotos demonstram CPT, após estudo imuno-histoquímico, em aumento de 100x (A e B) e 400x (C, D e E). A imagem A demonstra CPT sem expressão da proteína BRAFV600E. Nas demais imagens, nota-se presença de expressão de intensidade fraca (C), moderada (D) e forte (B e E), por meio da marcação de coloração marrom no citoplasma da célula. As setas indicam os núcleos opticamente vazios e a ponta de seta indica entalhe nuclear, características típicas do CPT, evidenciando que a expressão ocorre em tecido neoplásico.

Dentre os casos positivos, 69% ocorreram em pacientes com idade ≥ 45 anos (média de 49 anos), uma proporção maior do que naqueles com expressão de BRAFV600E negativa (46%; média de 42 anos), entretanto, não houve significância ao realizar a análise estatística ($p = 0,165$). Todos os casos do sexo masculino expressaram a proteína, assim como 62% dos femininos ($p = 0,281$). Não houve diferença significativa entre o tamanho dos tumores positivos e negativos para BRAFV600E ($p > 0,99$). Dos 26 casos avaliados para MTL, 15 possuíam a

proteína BRAFV600E positiva e, dentre esses, apenas 4 (26%) evidenciaram neoplasia metastática, o que não foi significativo para correlação entre as variáveis ($p = 0,708$).

TABELA 1. Caracterização de uma amostra de pacientes diagnosticados com carcinoma papilífero de tireoide, em laboratório de patologia do norte do estado do RS, entre o período de janeiro de 2016 e dezembro de 2017 ($n = 39$).

Características	n (%)
Idade	
≥ 45 anos	24 (61,5)
< 45 anos	15 (38,5)
Sexo	
Masculino	4 (10,3)
Feminino	35 (89,7)
Subtipo	
Clássico	31 (79,4)
Folicular	7 (18)
Outros	1 (2,5)
Tamanho da lesão primária	
≥ 2 cm	16 (41)
< 2 cm	23 (59)
Multifocalidade	
Presente	15 (38,5)
Ausente	24 (61,5)
Extensão extratireoidiana	
Presente	19 (48,7)
Ausente	20 (51,3)
Invasão vascular e/ou linfática	
Presente	18 (46,1)
Vascular	3 (7,7)
Linfática	9 (23,1)
Vascular e linfática	6 (15,4)
Ausente	21 (53,8)
Acometimento lobar, n°/n total	
Unilobares	25/36 (69,4)
Multilobares	11/36 (30,6)
Presença de Tireoidite de Hashimoto/Bócio Multinodular, n (%)	24 (61,5)
Metástases linfonodais, n°/n total (%)	
Presente	8/26 (30)
Ausente	18/26 (70)
Expressão de BRAF, n (%)	
Presente	26 (66,7)
Ausente	13 (33,3)
Intensidade de expressão, n°/n total (%)	
Forte	9/26 (34,6)
Moderada	12/26 (46,1)
Fraca	5/26 (19,2)
Porcentagem de expressão, n°/n total (%)	
Hiperexpressão (≥ 50 % das células)	8/26 (30)
Expressão (< 50 % das células)	18/26 (70)

Lateralidade, ETE e ILV também não obtiveram significância estatística e nota-se que, dos 26 casos positivos para a proteína, metade possuía EET. Curiosamente, dentre os 7 CPT com variante folicular, 4 deles expressaram o BRAFV600E. Além das variantes citadas, um tumor possuía variante oncócica, hiperexpressando a proteína, com intensidade forte e presença de EET, porém sem evidência de MTL ou ILV.

TABELA 2. Relação entre a expressão da proteína BRAFV600E e as variáveis clínico-patológicas dos 39 CPT.

Características	BRAF V600E	BRAF V600E	Valor de p
	(+) n = 26	(-) n = 13	
Idade \geq 45 anos, n° (%)	18 (69,2)	6 (46,2)	0,165
Sexo feminino, n° (%)	22 (84,6)	13 (100)	0,281
Tamanho da lesão primária \geq 2 cm, n° (%)	11 (42,3)	5 (38,5)	> 0,99
Lesões multilobares, n°/n total (%)	8/23 (34,8)	3/13 (23,1)	0,708
Metástase linfonodal, n°/n total (%)	4/15 (26,7)	4/11 (36,4)	0,683
Multifocalidade, n° (%)	9 (34,6)	6 (46,2)	0,508
Extensão extratireoidiana, n° (%)	13 (50)	6 (46,2)	> 0,99
Invasão vascular e/ou linfática, n° (%)	13 (50)	5 (38,5)	0,734

Ao analisar os tumores com expressão da proteína BRAFV600E para porcentagem e intensidade de expressão, nota-se predomínio de intensidade moderada (12/26, 46%) e de expressão em menos de 50% das células tumorais (18/26; 70%). Dentre os 8 casos de hiperexpressão de BRAFV600E, a maioria teve idade \geq 45 anos, era do sexo feminino e possuía presença de EET. Apenas 1 caso possuía MTL, 3 eram \geq 2 cm e metade apresentou multifocalidade, ILV e acometimento multilobar (Tabela 3). No entanto, não houve associação significativa entre essas variáveis e as características clínico-patológicas dos tumores.

TABELA 3. Relação entre intensidade e porcentagem de expressão da proteína BRAFV600E com as variáveis clínico-patológicas dos 39 carcinomas papilíferos de tireoide.

Características	Intensidade forte	Intensidade moderada	Intensidade fraca	Valor de p	Hiperexpressão de BRAFV600E	Expressão de BRAFV600E	Valor de p
	n = 9	n = 12	n = 5		n = 8	n = 18	
Idade \geq 45 anos (%)	6 (66,7)	10 (83,3)	2 (40)	0,207	6 (75)	12 (66,7)	0,671
Sexo feminino (%)	8 (89)	11 (91,7)	3 (60)	0,233	7 (87,5)	15 (83,3)	0,786
Tamanho da lesão primária \geq 2cm (%)	3 (33,3)	4 (33,3)	4 (80)	0,165	3 (37,5)	8 (44,4)	0,741
Lesões multilobares (%)	4 (50)	3 (30)	1 (20)	0,497	4 (57,1)	4 (25)	0,136
Metástase linfonodal (%)	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (33,3)	0,774	1 (33,3)	3 (25)	0,770
Multifocalidade (%)	4 (44,4)	4 (33,3)	1 (20)	0,649	4 (50)	5 (27,8)	0,272
Extensão extratireoidiana (%)	6 (66,7)	6 (50)	1 (20)	0,247	5 (62,5)	8 (44,4)	0,395
Invasão vascular e/ou linfática (%)	3 (33,3)	7 (58,3)	3 (60)	0,465	4 (50)	9 (50)	> 0,99

DISCUSSÃO:

Determinadas características clínico-patológicas já estão bem estabelecidas na literatura como fatores prognósticos para o carcinoma de tireoide, dentre elas destacam-se a idade (< 16 ou ≥ 45 anos), subtipo e sua variante (sendo a células-altas do subtipo clássico a mais agressiva), tumores de maior tamanho, presença de extensão extratireoidiana, invasão linfovascular e metástase linfonodal (7). Além desses, a mutação BRAFV600E vem sendo estudada como um possível novo fator preditor de mau prognóstico, e relacioná-la com tais características é uma forma de avaliar qual a importância do seu uso na prática clínica.

O perfil epidemiológico dos pacientes acometidos por CPT no presente estudo é condizente com o que está estabelecido pela literatura, afetando principalmente mulheres, tanto no mundo, como em estudos realizados no Brasil, os quais relataram média de idade entre 37 – 52 anos (6,16–19). A variante clássica, encontrada em 83% dos CPT, também foi a principal apresentação no estudo de Pereira (2019) e Xing (2005), citada pelo último como a segunda variante com maior índice de expressão de BRAFV600E e portanto, considerada como a mais agressiva, atrás apenas da variante de células altas, a qual não teve representação no presente estudo (1,18). Nos estudos de Nemetz (2011) e Pereira (2019), amostras menores (52/43) de CPT foram analisadas de forma retrospectiva, e a frequência de EET mostrou-se discordante, estando entre 9,3 – 35,2%, diferente dos 48% encontrados (18,19). A presença de multifocalidade nesses mesmos estudos estava de acordo com os 38,5% encontrados. Em comparação com a coorte de 619 pacientes publicada por Rojas et al. (2015)(20), a frequência de ILV (46%) mostrou-se superior aos 29,5% apresentados pelos autores, entretanto, 32% de sua amostra era composta por microcarcinomas papilíferos, o que pode influenciar a análise, já que possui um comportamento diferente. Neste trabalho, as MTL estavam presentes em 30% dos casos de CPT avaliados, o que está em concordância com o encontrado em outros estudos, que encontraram prevalência de 11-45% (12,18,21). A presença associada de tireoidite também foi um achado frequente em outros trabalhos (18). Poucos trabalhos avaliam se o tumor é unilobar ou multilobar, mas sabe-se que a maioria deles não são multifocais, portanto, infere-se que os unilobares são mais prevalentes (13).

A prevalência da mutação BRAFV600E em CPT é em torno de 29 – 77% nos estudos, o que se assemelha aos 66,7% verificados (12,14,22,23). Essa variação é ampla e possivelmente explicada pelas diferentes metodologias aplicadas. O método pelo qual a mutação é constatada varia entre IHQ, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e outros, devendo-se considerar que

a PCR detecta apenas a mutação, sem a confirmação de que o oncogene está, de fato, expressando a proteína, a qual é necessária para influenciar no comportamento da neoplasia (15). Ademais, há ampla diferença entre os tamanhos de amostras, a região da qual são provenientes, principalmente tratando-se do Oriente, onde parece haver maior prevalência de expressão de BRAFV600E, e entre as variantes de CPT que compõem o estudo, visto que as variantes clássicas e de células altas tendem a expressar a proteína mais frequentemente do que a variante folicular, o que causa diferença nos resultados de acordo com a prevalência de cada uma delas (18,22,24). Entretanto, no presente estudo, 4/7 CPT foliculares foram BRAF positivos, o que não era esperado, ainda mais para uma amostra de 39 casos (1).

A prevalência de expressão do BRAFV600E já é amplamente conhecida, porém, sua influência nas características clínicas e patológicas permanece questionável. Além de não existir consonância entre os estudos acerca da associação ou não da proteína com pior prognóstico, também não há consenso entre quais das características estariam relacionadas à presença da mutação. Nota-se que a EET e MTL foram as mais constantes na literatura, pois a maioria dos estudos, incluindo meta-análises, verificam associação com a presença da proteína e até com sua hiperexpressão (12,21,24–27). Entretanto, mesmo que no presente estudo houvesse porcentagem expressiva de pacientes com EET, essa relação não foi observada, provavelmente pelo limitado número de casos. A associação com as demais características, como idade, sexo, multifocalidade e tamanho, tem grande variação na literatura. De acordo com Guan et al. (2016), idade e tamanho não possuíam significância estatística, o que entra em discordância com diversos estudos, incluindo o atual, que verificam média de idade mais alta nos pacientes BRAFV600E positivos, assim como mais hiperexpressão nos ≥ 45 anos (13,18,22). Essa questão pode ser explicada pelo baixo poder estatístico de alguns estudos, pois nota-se que aqueles com amostras maiores, tendem a obter resultados favoráveis ao uso de BRAFV600E como fator prognóstico. ILV e multifocalidade também possuem diferentes graus de associação com a mutação de acordo com a metodologia empregada (13,24). Nesse estudo, além de essas variáveis não terem sido associadas à mutação, a maioria dos tumores positivos para o BRAFV600E possuía apenas uma lesão neoplásica, o que contraria a hipótese de que cause neoplasias mais agressivas.

Poucos estudos descrevem a relação entre a associação das variáveis com a intensidade e a porcentagem de células marcadas para a proteína. De acordo com os presentes resultados, pacientes com hiperexpressão parecem apresentar EET mais frequentemente, porém não houve significância estatística. Silva (2012), na análise de 116 pacientes, constatou associação entre

hiperexpressão e EET ($p = 0,0183$), mas a maioria (75%) dos pacientes com metástase à distância possuía expressão em $< 50\%$ das CT, o que se opõe ao esperado (21).

Nos últimos anos a literatura também descreveu uma possível aplicabilidade do BRAFV600E no diagnóstico diferencial de nódulos tireoidianos. O marcador parece ter valor diagnóstico nesses casos, uma vez que os CPT expressam significativamente mais proteína do que os nódulos tireoidianos benignos, o que auxiliaria na melhor caracterização dos mesmos quando a PAAF é considerada indeterminada, podendo auxiliar no manejo do paciente e até evitar a ressecção cirúrgica (14,28). Entretanto, a importância diagnóstica do BRAFV600E torna-se limitada para o CPT de variante folicular, pois mesmo apresentando uma alta prevalência de positividade no atual estudo, a literatura define-a como uma das que menos expressa a proteína (27). Essa linha de pesquisa traz a mutação BRAFV600E como uma ferramenta a mais no manejo dos nódulos tireoidianos, os quais têm aumentado em frequência em diversas partes do mundo (14).

Em relação às particularidades do presente estudo, nota-se que o anticorpo utilizado (RM8 Rmab) obteve sucesso na marcação das células tumorais e pode ser usado para detecção do BRAFV600E por IHQ. Como limitação, o estudo apresentou número limitado de amostra e a impossibilidade de seguimento desses pacientes e de identificação de metástases à distância, o que seria importante em estudos futuros, para que se tenha mais efetividade em elucidar qual o papel dessa mutação para o prognóstico dos pacientes.

CONCLUSÃO

De acordo com esse estudo, conclui-se que há alta prevalência da expressão da proteína BRAFV600E nos carcinomas papilíferos de tireoide. Quanto aos resultados obtidos na amostra estudada, não houve relação entre a presença da mutação e as características clinico-patológicas do tumor. É necessário que mais estudos sejam realizados, no intuito de avaliar amostras maiores, que contemplem quantidade significativa de casos com fatores de pior prognóstico ou que seja possível realizar seguimento dos pacientes, para que essa relação seja melhor estabelecida.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE BRAFV600E PROTEIN EXPRESSION IN THYROID PAPILLARY CARCINOMAS

Introduction: The thyroid cancer (TC) is the most common malignant neoplasm of the endocrine system, in which the papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most frequent histologic subtype. The PTC has an indolent evolution, however, a few still presents worse prognosis according to its clinical-pathological characteristics. Among the clinical-pathological characteristics the expression of the BRAFV600E protein is in continuous study due to its possible potential to assist in the diagnosis and prognosis of the patients. **Objective:** Analyse the immunohistochemistry expression of the BRAFV600E protein in the papillary thyroid carcinoma and link it with the clinical-pathological characteristics. **Material and Methods:** Cases of PTC ≥ 1 cm from patients who have partial or total thyroidectomy samples at the biobank of the pathology lab. The cases were analysed in terms of the expression of the BRAFV600E protein by the immunohistochemistry method and also in terms of its clinical-pathological characteristics. The variables studied and related with the expression of the BRAFV600E protein were: age, gender, thyroid side, size, multifocality, extrathyroidal extension, lymph node metastases e lymph vascular invasion. Intensity and percentage of the tumour cell's expression were also described and analysed. **Results:** The predominance of the BRAFV600E protein's mutation was detected in 26 (66,7%) of the 39 selected cases, most of them had moderate intensity (12/26, 46%) and expression of the tumoral cells under 50%. The presence of the BRAFV600E protein was verified in 4/7 PTC of follicular variant. There was not any association between the expression of the protein and the PTC's clinical-pathological characteristics. The intensity and the percentage of the protein's expression also did not show statistic significance. **Conclusion:** High prevalence of the BRAFV600E protein expression was found in the PTC, however, in the current study the positivity was not associated with the clinical-pathological characteristics that predict the tumour aggressivity, so it was not possible to conclude if there is prognosis value.

Keywords: Thyroid Neoplasms. Papillary Thyroid Carcinoma. Proto-Oncogene Proteins B-raf.

REFERÊNCIAS

1. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):245–62.
2. Agency for Research on Cancer I. No Title. WHO. 2019.
3. INCA. Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Vol. 1, Inca. 2014. 124 p.
4. Fagin JA, Wells SA. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(11):1054–67.
5. Seethala RR, Asa SL, Bullock MJ, Carty SE, Hodak SP, McHugh JB, et al. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Carcinomas of the Thyroid Gland. Washington, DC Coll Am Pathol. 2017;(June):1–22.
6. American, Association T. Thyroid Cancer (Papillary and Follicular). *Am Thyroid Assoc* [Internet]. 2016;4. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>
7. Schulumberger MJ. Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. *N Engl J Med*. 2013;338(5):297–306.
8. Papaleontiou M, Haymart MR. New insights in risk stratification of differentiated thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(1):1–7.

9. Tang KT, Lee CH. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2010;73(3):113–28. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1726-4901\(10\)70025-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1726-4901(10)70025-3)
10. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. 2002;949–54.
11. Mitsutake N, Nakashima M, Kondo S, Yamada M. Postnatal Expression of BRAF V600E Does Not Induce Thyroid Cancer in Mouse Models of Thyroid Papillary Carcinoma. 2013;154(November):4423–30.
12. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, et al. Extensive clinical experience: Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(11):4085–90.
13. Guan Y, Chen Q. Meta-Analyses of Association Between BRAF V600E Mutation and Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Carcinoma. 2016;763–76.
14. Huang L, Wang X, Huang X, Gui H, Li Y, Chen Q, et al. Diagnostic significance of CK19, galectin-3, CD56, tpo and Ki67 expression and BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Oncol Lett*. 2018;15(4):4269–77.
15. Kowalik A, Kowalska A, Walczyk A, Chodurska R, Kopczyński J, Chrapek M, et al. Evaluation of molecular diagnostic approaches for the detection of BRAF p.V600E mutations in papillary thyroid cancer: Clinical implications. *PLoS One*. 2017;12(6):1–13.
16. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2014;140(4):317–22.
17. Rocha RM, Santos MCLFS, Musso C, Santos MH de S, de-Almeida ML, Miguel GPS. Carcinoma bem diferenciado de tireoide: perfil epidemiológico, resultados cirúrgicos e resposta oncológica. *Rev Col Bras Cir*. 2018;45(5):1–9.
18. Pessôa-Pereira D, Medeiros MF da S, Lima VMS, Silva JC da, Cerqueira TL de O, Silva IC da, et al. Association between BRAF (V600E) mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma: a Brazilian single-centre case series. *Arch Endocrinol Metab* [Internet]. 2019;1–10. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972019005001110&lng=en&nrm=iso
19. Nemetz AB, Neoplasias E De. Artigo Original Carcinoma papilífero da glândula tireoide : uma análise. 2011;1–4.
20. Romero A, Cuervo-Martínez J, Osorio-Arango L, Olaya N. Histological variants and prognostic factors of papillary thyroid carcinoma at the National Cancer Institute of Colombia. *Biomedica*. 2015;35(3):429–36.
21. Da Silva CR. Análise Da Mutação V600E Do Gene Braf E Detecção Imuno-Histoquímica Da Proteína Braf Em Carcinomas Análise Da Mutação V600E Do Gene Braf E Detecção Imuno-Histoquímica Da Proteína Braf Em Carcinomas. Diss apresentada ao Programa Pós Grad em Genética da Pontifícia Univ Católica Goiás, como requisito parcial para a obtenção do Título Mestre em Genética. 2012;0–79.
22. Lin J-D, Fu S-S, Chen J-Y, Lee C-H, Chau W-K, Cheng C-W, et al. Clinical Manifestations and Gene Expression in Patients with Conventional Papillary Thyroid Carcinoma Carrying the BRAF V600E Mutation and BRAF Pseudogene . *Thyroid*. 2016;26(5):691–704.
23. Sancisi V, Nicoli D, Ragazzi M, Piana S, Ciarrocchi A. BRAFV600E mutation does not mean distant metastasis in thyroid papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):1745–9.
24. Fraser S, Go C, Aniss A, Sidhu S, Delbridge L, Learoyd D, et al.

- BRAFV600EMutation is Associated with Decreased Disease-Free Survival in Papillary Thyroid Cancer. *World J Surg*. 2016;40(7):1618–24.
25. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, et al. BRAF (V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(1):191–205.
 26. Liu C, Chen T, Liu Z. Associations between BRAF and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: A meta-analysis. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2016;14(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12957-016-0979-1>
 27. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: A meta-analysis. *Cancer*. 2007;110(1):38–46.
 28. Pupilli C, Pinzani P, Salvianti F, Fibbi B, Rossi M, Petrone L, et al. Circulating BRAFV600E in the diagnosis and follow-up of differentiated papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):3359–65.