

**ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DA PESQUISA DAS  
MUTAÇÕES NOS GENES *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* E  
*PIK3CA* EM ESPÉCIMES OBTIDOS POR PUNÇÃO  
ASPIRATIVA POR AGULHA FINA PARA AVALIAÇÃO PRÉ-  
OPERATÓRIA DE NÓDULOS TIREOIDIANOS**

**ANDRÉ LOYOLA DUARTE**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade  
Co-Orientadora: Dra Renata de Almeida  
Coudry**

**São Paulo  
2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Duarte, André Loyola

**Análise da contribuição da pesquisa das mutações nos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em espécimes obtidos por punção aspirativa por agulha fina para avaliação pré-operatória de nódulos tireoidianos** / André Loyola Duarte – São Paulo; 2012.

85p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.

Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA. 2. GENES  
3. NÓDULO DA GLÂNDULA TIREOIDE. 4. MUTAÇÃO. 5. GLÂNDULA  
TIREOIDE.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Fernando de Oliveira Duarte, Cristiana Aparecida Loyola Duarte; irmãos, Mariana Loyola Duarte, Pedro Loyola Duarte e esposa, Livia de Almeida Rossi.

## **AGRADECIMENTOS**

Meu sincero agradecimento ao Dr. Victor Piana de Andrade pela orientação e dedicação essenciais na realização deste projeto.

A todo departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo incluindo os preceptores, residentes e funcionários pela fundamental colaboração, em especial, ao Dr. Fernando Augusto Soares por sua eficiência e prestatividade na viabilização deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Paulo Kowalski e todo o departamento de Cabeça e Pescoço pela colaboração na coleta dos dados clínicos.

Ao departamento de Biologia Molecular e a todo o CIPE (Centro Internacional de Pesquisa), em especial o biólogo Rodrigo Crespo pela importante contribuição técnica.

A todos os funcionários da pós-graduação e da biblioteca em especial à Ana Kuninari, Vanuza, Luciana e Suely Francisco.

## RESUMO

Duarte AL. **Análise da contribuição da pesquisa das mutações nos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em espécimes obtidos por punção aspirativa por agulha fina para avaliação pré-operatória de nódulos tireoidianos.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Contexto:** A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) com análise citológica é amplamente utilizada e considerada o método de escolha na avaliação pré-operatória de nódulos tireoidianos. Porém, em aproximadamente 20% das punções os achados citológicos são indeterminados e incapazes de distinguir o câncer dos nódulos de natureza benigna criando dificuldades para o acompanhamento dos pacientes. Avanços recentes em biologia molecular têm ajudado a identificar marcadores que podem ser úteis no diagnóstico e prognóstico dos tumores tireoidianos. **Objetivo:** Avaliar a frequência das mutações dos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em espécimes de punção aspirativa por agulha fina e sua contribuição para análise pré-operatória de nódulos da glândula tireoide. **Material e métodos:** Foram incluídos prospectivamente 100 pacientes preferencialmente portadores de resultados citológicos indeterminados ou positivos para malignidade com um total de 107 nódulos tireoidianos cujos espécimes citológicos e cirúrgicos foram testados para mutações somáticas dos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* através da técnica do pirosequenciamento. Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos testes genéticos e sua associação com a PAAF foram determinados com base nos resultados de diagnóstico histológico. **Resultados:** Setenta e cinco dos 107 nódulos tireoidianos possuíam resultados citológicos indeterminados sendo o restante constituído por 23 malignos e 09 benignos. A frequência das mutações em *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em

espécimes citológicos foi de 41,1%, 7,5%, 0,9%, 4,6% e 0% respectivamente. O teste para a mutação em *BRAF* mostrou 100% de especificidade, VPP e aumentou a sensibilidade de 30,67% para 65,33% quando associada à PAAF. A contribuição da detecção das mutações nos outros genes (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA*) foi limitada pela baixa frequência e pela diminuição da especificidade e VPP ao mostrar-se presente em nódulos benignos. **Conclusões:** A detecção da mutação em *BRAF* em amostras de PAAF de tireoide é viável e foi capaz de aumentar significativamente a sensibilidade do diagnóstico pré-operatório dos nódulos malignos e poderia, portanto, ser utilizada como ferramenta adjuvante para diagnóstico.

## SUMMARY

Duarte AL. **Analysis of the contribution of the *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* and *PIK3CA* mutations in fine needle aspiration biopsy specimens for the preoperative evaluation of thyroid nodules.** São Paulo, 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Context:** Fine needle aspiration (FNA) is considered the method of choice for preoperative assessment of thyroid nodules. However, approximately 20% result in indeterminate reports adding difficulties to clinicians to manage patients. Recent advances in molecular biology identified biomarkers of potential aid to diagnosis and prognosis of thyroid tumors. **Objective:** We aimed to assess the frequency *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* and *PIK3CA* genes mutations in FNA specimens and its contribution to preoperative evaluation of thyroid nodules. **Methods:** One hundred patients with paired FNA and surgical specimens, preferably diagnosed with indeterminate or positive for malignancy FNA were included. A total of 107 thyroid nodules were tested for *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* and *PIK3CA* somatic mutations using pyrosequencing. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of each test done on FNA were determined compared to final histological diagnosis. **Results:** Seventy-five out of 107 thyroid nodules were diagnosed indeterminate whereas 23 were malignant and 9 were benign. The frequency of *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* and *PIK3CA* mutations on FNA specimens was 41.1%, 7.5%, 0.9%, 4.6% and 0% respectively. *BRAF* mutation showed 100% specificity and PPV and increased FNA sensitivity from 30.67% to 65.33% . The contribution of other mutations was limited by the low frequency, poor specificity and sporadic false positive cases. **Conclusions:** The evaluation of *BRAF* mutation in thyroid FNA samples is feasible and contributes significantly to increase FNA sensitivity in preoperative diagnosis and is a helpful diagnostic tool.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Modelo de carcinogênese de neoplasias da tireoide.....	8
<b>Figura 2</b>	Vias de sinalização celular em células foliculares.....	9
<b>Figura 3</b>	Gel de agarose 2% de amostras de DNA amplificadas por PCR para o gene <i>BRAF</i> .....	26
<b>Figura 4</b>	Pirograma com análise quantitativa de incorporação de nucleotídeos.....	39
<b>Figura 5</b>	Pirograma com análise quantitativa de incorporação de nucleotídeos.....	39
<b>Figura 6</b>	Frequência entre as classes de diagnóstico citológico.....	43
<b>Figura 7</b>	Exemplo de citologia NF/SNF (IV).....	43
<b>Figura 8</b>	Frequência das classes de diagnóstico histológico.....	44
<b>Figura 9</b>	Exemplo de um corte histológico (espécime cirúrgico) com diagnóstico de Bócio coloide.....	45
<b>Figura 10</b>	Carcinoma papilífero clássico (espécime cirúrgico).....	45
<b>Figura 11</b>	Distribuição das classes de diagnóstico citológico (Bethesda) em relação a malignidade confirmada na histologia.....	46
<b>Figura 12</b>	Correlação da concentração da quantidade de DNA extraído dos espécimes citológicos e dos espécimes cirúrgicos emblocados em parafina.....	47

<b>Figura 13</b>	Figura esquemática demonstrando os três procedimentos realizados em cada caso.....	48
<b>Figura 14</b>	Pirogramas demonstrando presença da mutação em <i>BRAF</i> tanto no espécime citológico (gráfico superior) quanto no espécime cirúrgico (gráfico inferior).....	50
<b>Figura 15</b>	Correlação entre a presença da mutação do gene <i>BRAF</i> por análise quantitativa (%) entre os espécimes citológicos e espécimes cirúrgicos emblocados em parafina.....	51
<b>Figura 16</b>	Correlação entre a presença da mutação do gene <i>HRAS</i> códon 61 por análise quantitativa (%) entre os espécimes citológicos e espécimes cirúrgicos emblocados em parafina....	51
<b>Figura 17</b>	Exemplo de citologia classificada como suspeito para malignidade.....	52
<b>Figura 18</b>	Distribuição da presença da mutação do gene <i>BRAF</i> dentre as classes de diagnóstico citológico Bethesda 2007 correlacionada ao diagnóstico histopatológico dos espécimes cirúrgicos correspondentes (III = ASI/LFSI, IV = NF/SNF, V = Suspeito para malignidade).....	64
<b>Figura 19</b>	Organograma com riscos de malignidade de acordo com o “status” mutacional de <i>BRAF</i> vistos nas diferentes classes citológicas indeterminadas com proposta de tratamento inicial	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Sistema Bethesda para relatório citopatológico de tireoide com risco de malignidade implícito e manuseio clínico recomendado.....	4
<b>Tabela 2</b>	Protocolo - PCR para <i>BRAF</i> com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.....	26
<b>Tabela 3</b>	Protocolo - PCR para <i>NRAS</i> com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.....	29
<b>Tabela 4</b>	Protocolo - PCR para <i>HRAS</i> com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.....	31
<b>Tabela 5</b>	Protocolo - PCR para <i>KRAS</i> com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.....	34
<b>Tabela 6</b>	Protocolo - PCR para <i>PIK3CA</i> (exons 9 e 20) com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.....	38
<b>Tabela 7</b>	Frequência por variáveis clínicas e histopatológicas.....	42
<b>Tabela 8</b>	Correlação entre as classes de diagnósticos citológicos e histológicos.....	46
<b>Tabela 9</b>	Distribuição das mutações encontradas nos genes <i>HRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> e <i>PIK3CA</i> correlacionadas aos diagnósticos citológicos e histopatológicos (n=20).....	49

<b>Tabela 10</b>	Correlação do status do <i>BRAF</i> no espécime citológico com o diagnóstico citológico.....	52
<b>Tabela 11</b>	Correlação das variáveis clinico-patológicas com o status do gene <i>BRAF</i> avaliado entre os casos confirmados como maligno no espécime cirúrgico (75 nódulos, 71 pacientes, 07-esvaziamento cervical).....	56
<b>Tabela 12</b>	Correlação das variáveis clínicas com o status do gene <i>BRAF</i> entre os casos confirmados como maligno no espécime cirúrgico (n=71).....	57
<b>Tabela 13</b>	Análise da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para PAAF isoladamente, para a detecção da mutação no gene <i>BRAF</i> como teste molecular e para a associação dos dois testes.....	57

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AF</b>	Adenoma Folicular
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>ALD</b>	André Loyola Duarte
<b>ASI/LFSI</b>	Atipia de Significado Indeterminado/ Lesão Folicular de Significado Indeterminado
<b>ATA</b>	American Thyroid Association
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BC</b>	Bócio Coloide
<b>BRAF</b>	Human v-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
<b>Ca</b>	Câncer
<b>CIPE</b>	Centro Internacional de Pesquisa
<b>CP</b>	Carcinoma Papilífero
<b>CPVF</b>	Carcinoma Papilífero Variante Folicular
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>FNA</b>	Fine Needle Aspiration
<b>GTP</b>	Guanosina Trifosfato
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HF</b>	Hiperplasia Folicular
<b>HRAS</b>	Human v-Ha-ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>KRAS</b>	Human v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>mCP</b>	Microcarcinoma Papilífero
<b>mCPVF</b>	Microcarcinoma Papilífero Variante Folicular
<b>NCI</b>	Nacional Cancer Institute
<b>NF/SNF</b>	Neoplasia Folicular/ Suspeito para Neoplasia Folicular

<b>NRAS</b>	Human Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
<b>PAAF</b>	Punção Aspirativa por Agulha Fina
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PIK3CA</b>	Human Phosphoinositide-3-Kinase Catalytic Alpha Polypeptide
<b>PPI</b>	Fosfato Inorgânico
<b>PSQ</b>	Pyrosequencing
<b>SEER</b>	Surveillance Epidemiology and End Results
<b>SM</b>	Suspeito para Malignidade
<b>TLC</b>	Tireoidite Linfocítica Crônica
<b>VPA</b>	Victor Piana de Andrade
<b>VPN</b>	Valor Preditivo Negativo
<b>VPP</b>	Valor Preditivo Positivo

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
3.1	Objetivo geral .....	17
3.2	Objetivos específicos .....	17
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	Critérios de inclusão .....	19
4.2	Critérios de exclusão .....	19
4.3	Amostras .....	20
4.3.1	Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF).....	20
4.3.2	Citologia.....	21
4.3.3	Histologia.....	22
4.3.4	Dados clínicos .....	23
4.3.5	Extração de DNA dos espécimes citológicos .....	23
4.3.6	Extração de DNA dos espécimes cirúrgicos emblocados em parafina..	24
4.4	Avaliação do gene <i>BRAF</i> .....	24
4.4.1	Sequência exônica – <i>BRAF</i> .....	24
4.4.2	PCR – <i>BRAF</i> .....	25
4.5	Avaliação do gene <i>NRAS</i> .....	27
4.5.1	Sequência exônica – <i>NRAS</i> .....	27
4.5.2	PCR – <i>NRAS</i> .....	28
4.6	Avaliação do gene <i>HRAS</i> .....	29
4.6.1	Sequência exônica – <i>HRAS</i> .....	29
4.6.2	PCR- <i>HRAS</i> .....	31
4.7	Avaliação do gene <i>KRAS</i> .....	32
4.7.1	Sequência exônica - <i>KRAS</i> .....	32

4.7.2	PCR – <i>KRAS</i> .....	33
4.8	Avaliação do gene <i>PIK3CA</i> .....	34
4.8.1	Sequência exônica <i>PIK3CA</i> .....	34
4.8.2	PCR – <i>PIK3CA</i> .....	37
4.9	Pirossequenciamento .....	38
4.10	Análise Estatística .....	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Protocolo de análise de peça cirúrgica carcinoma da tireoide
- Anexo 2** Estadiamento patológico TNM - American Joint Committee on Cancer (AJCC)
- Anexo 3** Protocolo de Avaliação Clínica de pacientes portadores de Doença Nodular Tireoidiana
- Anexo 4** Protocolo de extração de DNA dos espécimes citológicos
- Anexo 5** Protocolo de extração de DNA dos espécimes cirúrgicos emblocados em parafina

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece cinco diferentes subtipos histológicos de tumores originados do epitélio folicular tireoidiano. Seus comportamentos biológicos variam de crescimento indolente, como nos carcinomas bem diferenciados papilífero e folicular ao extremamente agressivo como no carcinoma indiferenciado (anaplásico) (DELELLIS et al. 2004).

O câncer da tireoide representa entre 2% e 5% do total de câncer em mulheres e menos de 2% em homens sendo a América Central, Japão e Ilhas do Pacífico consideradas áreas de alto risco para o desenvolvimento do câncer da tireoide em mulheres, com uma incidência superior a 5 casos novos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 10.590 casos novos de câncer da tireoide no Brasil em 2012, com uma incidência estimada de 11 casos a cada 100 mil mulheres. Este tumor é o terceiro mais incidente nas mulheres da região Norte (7/100 mil), o quarto mais incidente nas regiões Sudeste (15/100 mil) e Nordeste (6/100 mil), o quinto mais incidente nas regiões Sul (10/100 mil) e o sexto mais incidente na região Centro-Oeste (6/100 mil) (Ministério da Saúde 2011). Estima-se que 56.460 novos casos de câncer de tireoide ocorram em 2012 nos Estados Unidos com 3 em cada 4 casos ocorrendo em mulheres (American Cancer Society-ACS 2012). A taxa de incidência deste câncer vem aumentando desde meados da década de 1990. Em um

relatório com base no banco de dados do *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) no período entre 1992 a 2009, a incidência do carcinoma papilífero aumentou de 5,8 para 13,6 por 100 mil em ambos os sexos. Desde 2004, as taxas de incidência vem aumentando em 5,5 % por ano nos homens e 6,6 % por ano nas mulheres (NCI 2012). Este aumento parece estar relacionado à melhor detecção de estágios iniciais através de métodos sensíveis de imagem e biópsia aspirativa por agulha fina (DAVIES e WELCH 2006; ASCHEBROOK-KILFOY et al. 2011).

Estima-se que 1.780 mortes por câncer de tireoide ocorram em 2012 nos EUA (ACS 2012). De 2004 a 2008, a taxa de morte por este câncer aumentou ligeiramente de 0,47 (por 100.000) para 0,50 nos homens e de 0,47 para 0,52 nas mulheres (ACS 2012).

O carcinoma papilífero é o subtipo mais freqüente de carcinoma da tireoide, correspondendo a cerca de 80% dos casos, tem caráter esporádico em cerca de 95% dos casos e familiar nos 5% restantes (ROSAI et al. 1994; DELELLIS et al. 2004; KEBEBEW et al. 2007; SIPOS e MAZZAFERRI 2010). Manifesta-se mais freqüentemente em adultos entre 20 e 50 anos com predomínio do sexo feminino (4:1) (DELELLIS et al. 2004) e é um achado fortuito em 10 % das necropsias (YAMAMOTO et al. 1990).

A apresentação inicial do câncer de tireoide é normalmente como um nódulo. Nódulo tireoidiano palpável é um achado relativamente comum, encontrado em 4% a 7% da população adulta da América do Norte (HEGEDUS 2004) e nódulos menores podem ser detectados por ultrasonografia em um terço ou mais dos adultos assintomáticos (BRANDER et

al. 1991; BRUNETON et al. 1994). Devido à baixa prevalência de malignidade em nódulos tireoidianos solitários (cerca de 5% em adultos) (WERK et al. 1984; BELFIORE et al. 1989; HEGEDUS 2004), o desafio primário é identificar a minoria dos nódulos que são malignos.

A punção aspirativa por agulha fina com análise citológica é o principal método diagnóstico pré-operatório (YANG et al. 2007). Sua principal limitação inclui os cerca de 15-20% dos casos onde os achados citológicos são indeterminados para malignidade (BALOCH et al. 2008). A falta de diagnóstico definitivo dificulta a condução clínica e frequentemente leva a cirurgias para nódulos que se mostram benignos à histologia.

O NCI através da “NCI Thyroid FNA State of the Science Conference” em Bethesda, recentemente formulou consensualmente uma recomendação para uniformizar os termos a serem utilizados em laudos citológicos de nódulos tireoidianos baseada em um sistema de notificação com 6 categorias diagnósticas com diferentes riscos de malignidade: I- Não diagnóstico/Insatisfatório, II- Benigno, III- Atipia de significado indeterminado ou Lesão folicular de significado indeterminado (ASI/LFSI), IV- Neoplasia folicular ou Suspeito para neoplasia folicular (NF/SNF), V- Suspeito para malignidade (SM) e VI- Maligno. A vantagem desta nomenclatura é a melhor padronização dos laudos com riscos de malignidade atribuíveis a cada categoria, que auxiliam na decisão clínica (Tabela 1) (CIBAS et al. 2009).

**Tabela 1** - Sistema Bethesda para relatório citopatológico de tireoide com risco de malignidade implícito e manuseio clínico recomendado

<b>Categoria Diagnóstica</b>	<b>Risco de Malignidade (%)</b>	<b>Manuseio Clínico*</b>
<b>I- Não diagnóstico /Insatisfatório</b>	1-4	Repetir PAAF guiada por ultrassom
<b>II- Benigno</b>	0-3	Seguimento clínico
<b>III- Atipia de significado indeterminado/Lesão folicular de significado indeterminado</b>	~5-15**	Repetir PAAF
<b>IV- Neoplasia folicular/ Suspeito para neoplasia folicular</b>	15-30	Lobectomia
<b>V- Suspeito para malignidade</b>	60-75	Tireoidectomia total ou Lobectomia***
<b>VI- Maligno</b>	97-99	Tireoidectomia total***

PAAF: Punção aspirativa por agulha fina, \* O manuseio clínico pode depender de outros fatores (p. ex: clínicos e ultrassonográficos) além da interpretação da PAAF, \*\*Estimativa extrapolada a partir de dados histopatológicos de pacientes com "resultados atípicos repetidos", \*\*\*No caso de "suspeito de tumor metastático" ou um resultado "maligno", indicando tumor metastático, ao invés de uma malignidade primária da tireoide, a cirurgia não pode ser indicada.

A adoção deste sistema tem demonstrado facilitação na comunicação entre citopatologistas, endocrinologistas, cirurgiões, radiologistas e outros prestadores de serviço de saúde. Ele permite melhora na correlação citohistológica, investigação da epidemiologia, biologia molecular e patologia das doenças da tireoide e o compartilhamento fácil e seguro de dados entre laboratórios diferentes com possibilidade de desenvolvimento de estudos colaborativos nacionais e internacionais.

O tratamento utilizado para o câncer bem diferenciado da tireoide é

cirúrgico complementado ou não por radioiodoterapia. A cirurgia pode variar de tireoidectomia parcial a tireoidectomia total, com ou sem dissecação de linfonodos regionais. O tratamento de cada caso é definido por fatores preditivos de risco elevado para recorrência e incluem:

1 *Dados do paciente:*

- Idade < 15 anos ou > 45 anos
- Sexo masculino
- História familiar de câncer da tireoide

2 *Características do tumor:*

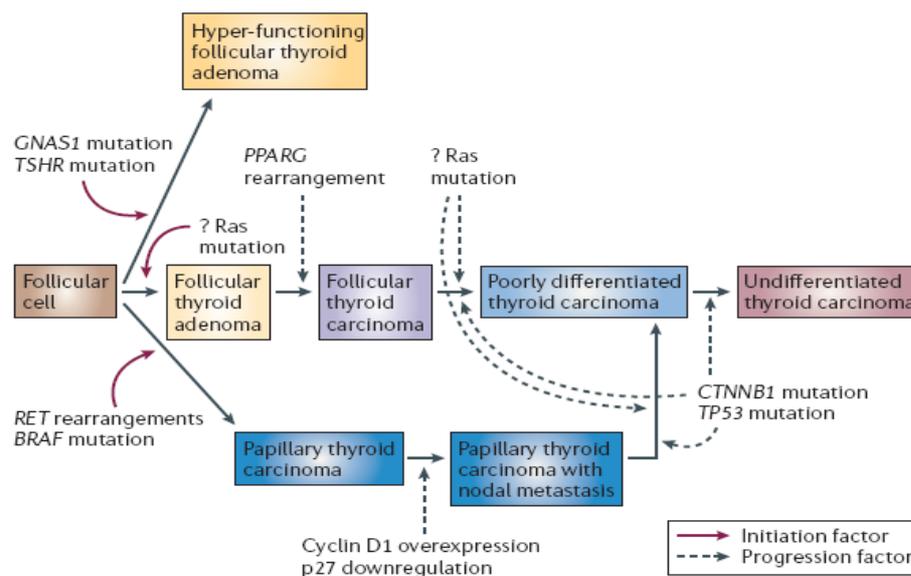
- Tumor > 4 cm de diâmetro
- Doença bilateral
- Extensão extratireoidiana
- Invasão vascular
- Linfonodos cervicais ou mediastinais acometidos
- Alguns subtipos e variantes tumorais: Hurtle, células altas, colunar, esclerosante difusa e insular
- Atipia nuclear acentuada, necrose tumoral e invasão vascular
- Baixa ou nenhuma captação de iodo no tumor ou nas metástases
- Metástases à distância

A *American Thyroid Association-ATA* (2009), em seu recente artigo de revisão de orientações para o manuseio de pacientes portadores de nódulos tireoidianos faz as seguintes recomendações: pacientes com nódulo solitário indeterminado que preferem um procedimento cirúrgico mais limitado podem ser submetidos à lobectomia como abordagem cirúrgica inicial. A

tireoidectomia total é indicada em pacientes com nódulos indeterminados quando maiores do que 4 cm, presença de acentuada atipia na PAAF, nódulo classificado como "suspeito para malignidade," em pacientes com história familiar de carcinoma da tireoide ou de exposição à radiação. Pacientes com nódulos indeterminados que têm doença nodular bilateral, ou aqueles que preferem se submeter a tireoidectomia total para evitar uma possível necessidade de uma cirurgia futura no lobo contralateral, também podem ser submetidos a tireoidectomia total ou quase total. Para os pacientes com câncer de tireoide > 1 cm, o procedimento cirúrgico inicial deve ser a tireoidectomia total ou quase total, a menos que hajam contra-indicações para esta cirurgia. Idade avançada (> 45 anos), pode também ser um critério para recomendação da tireoidectomia total ou quase total, mesmo com tumores <1-1,5 cm, devido ao aumento das taxas de recorrência nesta faixa etária (RUBINO et al. 2003). O aumento da extensão da cirurgia primária pode melhorar a sobrevida de pacientes de alto risco (SAMAAN et al. 1992) e de baixo risco (BILIMORIA et al. 2007). Um estudo de mais de 50.000 pacientes com Carcinoma papilífero encontrou na análise multivariada que a tireoidectomia total melhora significativamente os índices de recorrência e taxas de sobrevida de tumores > 1,0 cm (BILIMORIA et al. 2007). Quando analisados separadamente, até mesmo pacientes com tumores medindo entre 1,0 e 2,0 cm que se submeteram a lobectomia, tiveram um risco 24% maior de recorrência com 49% maior risco de mortalidade por câncer de tireoide ( $p = 0,04$  e  $p < 0,04$ , respectivamente) (BILIMORIA et al. 2007). Outros estudos também demonstraram que as

taxas de recorrência são reduzidas entre os pacientes de baixo risco que foram submetidos à tireoidectomia total ou quase total (SHAHA et al. 1997; SANDERS e CADY 1998; HAY et al. 2002). Lobectomia pode ser suficiente para o tratamento de pequenos nódulos, de baixo risco, unifocal, intratireoidianos, na ausência de irradiação prévia de cabeça e pescoço ou metástases cervicais nodais detectadas clínica ou radiologicamente. O argumento a favor da cirurgia parcial é a menor taxa de complicações (lesão definitiva do nervo laríngeo recorrente e hipoparatiroidismo definitivo). Apesar disso, alguns autores defendem a tireoidectomia total argumentando que não existem evidências na literatura de que pacientes com tecido tireoidiano remanescente possam ser acompanhados de forma segura por longo prazo, além da possibilidade de presença de doença microscópica no lobo oposto, facilitação do seguimento com dosagem de tireoglobulina e a alta taxa de complicações em eventuais reoperações (WARD et al. 2006; SHAHA 2000).

Sabe-se que diferentes eventos genéticos correlacionam-se com o desenvolvimento dos carcinomas papilíferos e foliculares e que o carcinoma indiferenciado pode se originar de um carcinoma bem diferenciado através de múltiplos processos de mutação e expansão clonal (WYNFORD-THOMAS 1997; KONDO et al. 2006) (Figura 1).

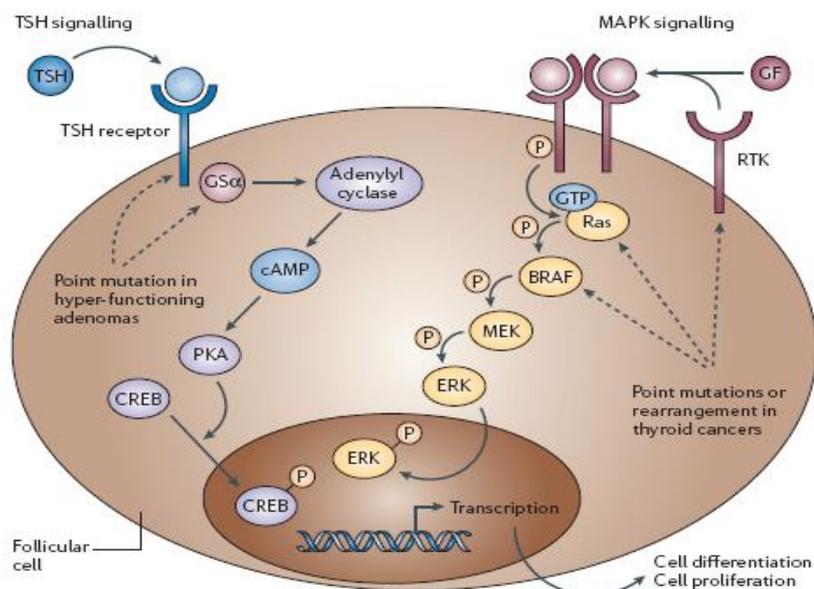


Fonte: KONDO et al. (2006)

**Figura 1** - Modelo de carcinogênese de neoplasias da tireoide. O modelo proposto de carcinogênese da tireoide é baseado em conceitos gerais e vias específicas. Baseado em observações clínicas, histológicas e moleculares; três diferentes vias são propostas para a proliferação neoplásica de células foliculares da tireoide, incluindo o adenoma folicular da tireoide hiperfuncionante (tumores que são quase sempre benignos sem propensão para progressão), carcinoma folicular e papilífero da tireoide. Defeitos genéticos que resultam em ativação do RET ou BRAF representam eventos recentes, inicializadores que podem estar associados com exposição à radiação. A hipossupressão do inibidor ciclina dependente quinase p27 e a superexpressão de ciclina D1 são fortes preditores de metástases linfonodais em carcinomas papilíferos da tireoide. Considera-se que a maioria dos carcinomas pouco diferenciados e indiferenciados da tireoide são derivados de um carcinoma bem diferenciado pré-existente com eventos genéticos adicionais, incluindo a acumulação nuclear de beta-catenina (que é codificada pelo gene *CTNNB1*) e inativação do p53.

Avanços em biologia molecular têm ajudado a identificar marcadores que são possíveis indicadores de agressividade de tumores tireoidianos.

Mutações no gene *BRAF* foram identificadas como responsáveis pela ativação da via MAPK (Mitogen-activated protein kinase) em câncer da tireoide. O *BRAF* que é um proto-oncogene situado no locus 7q34 codifica uma serina / treonina quinase que regula sinais de transdução na cascata RAS - RAF - MEK - ERK (Figura 2).



Fonte: KONDO et al. (2006)

**Figura 2** - Vias de sinalização celular em células foliculares. As células foliculares da tireoide expressam receptores de membrana celular de hormônio estimulador da tireoide (TSH)- são receptores transmembrana acoplados à proteína G. O TSH ativa este receptor e proteínas G, como a GS, na superfície celular de células foliculares e induz a produção intracelular de AMP cíclico (cAMP) através da adenilil ciclase. cAMP estimula a proteína quinase A dependente de cAMP (PKA) que então fosforila proteínas alvo citoplasmáticas e nucleares. Um substrato da PKA é o fator de transcrição nuclear CREB, que ativa a transcrição dos genes responsivos ao cAMP depois de ser fosforilado pelo PKA. Fatores de crescimento (GF) induzem a dimerização de receptores de tirosina quinase (RTK) resultando na fosforilação de resíduos de tirosina específicos no citoplasma. Em cooperação com adaptadores do receptor, RTK fosforilado ativa o Ras pela catalização da substituição do GDP por GTP. Nesta forma GTP-bound, o RAS ativa a atividade quinase do BRAF e sua cascata de sinalização. O BRAF fosforila a MAPK, MEK, que fosforila e ativa ERK (extracellular-signalregulated kinase). O ERK ativado migra para o núcleo onde fosforila e ativa vários fatores de transcrição que estão envolvidos em proliferação e diferenciação celular como o MYC e ELK1.

A mutação no gene *BRAF* ocasiona um ganho de função e leva a uma rota alternativa para ativação aberrante do ERK implicando na tumorigênese de vários cânceres humanos como, por exemplo, melanoma e carcinoma do cólon. Mutações no gene *BRAF* são restritas ao domínio quinase localizadas nos exons 11 e 15 (TROVISCO et al. 2006). A mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> na

posição do nucleotídeo 1799 é uma transversão de uma timina por uma adenina que resulta em uma conversão de valina a glutamato e causa ativação da BRAF quinase independente da ativação do RAS.

O gene *BRAF* mutado é encontrado em carcinomas papilíferos em cerca de 40% dos casos, variando entre 18 a 87% nos diferentes estudos e estão correlacionados com casos que apresentam metástases à distância e estágio clínico mais avançado (KIMURA et al. 2003; FUKUSHIMA et al. 2003; XING 2005). É encontrado também em mais de 13% dos carcinomas pouco diferenciados e em 35% dos carcinomas indiferenciados (KONDO et al. 2006). Há forte evidência clínica de que essa mutação está presente apenas em carcinoma papilífero e em alguns carcinomas anaplásicos (talvez derivados de carcinoma papilífero), mas nunca em carcinoma folicular, neoplasias benignas da tireoide e carcinoma medular da tireoide (MACIEL et al 2005). Mais freqüentemente a mutação é observada em pacientes com idade mais avançada e diferenças em gênero ainda são controversas. Existe uma alta prevalência da mutação na variante de células altas do carcinoma papilífero (55-100 %) enquanto há baixa prevalência na variante folicular (7-14 %) (KONDO et al. 2006). A freqüência de mutações do *BRAF* em carcinomas indiferenciados de tireoide com componente papilífero é significativamente maior (60-78%) do que aqueles sem tal componente (0-4%) (QUIROS et al. 2005; KONDO et al. 2006). A expressão de *BRAF*<sup>V600E</sup> em células da tireoide de ratos transgênicos resultam em carcinoma papilífero com aspectos de células altas e focos de pouca diferenciação (KNAUF et al. 2005). Desta maneira, tem sido proposto que a

mutação do *BRAF* está relacionada a um comportamento mais agressivo dos carcinomas papilíferos da tireoide.

Três genes *RAS* humanos, *NRAS* (localizado no cromossomo 1p13.2), *HRAS* (11p15.5) e o *KRAS* (12p12.1) estão frequentemente envolvidos em tumorigênese. Mutações no gene *RAS* produzem proteínas *RAS* constitutivamente ativas (p21ras) que são chave para transdução de sinais intracelulares que podem ativar muitas vias, entre elas a via RAF-MEK-ERK e a via AKT (BOS 1989; PEYSSONNAUX e EYCHÈNE 2001). Mutações pontuais afetando o domínio de ligação com GTP (guanosina trifosfato) nos códons 12/13 ou o domínio da GTPase no códon 61, determinam a substituição de resíduos aminoácidos específicos que dão à p21ras uma forma GTP-ligante resultando em uma ativação constitutiva da proteína e consequente desenvolvimento tumoral (BOS 1989).

Mutações do *RAS* são particularmente prevalentes em carcinoma folicular da tireoide, adenoma folicular da tireoide e menos frequentemente em carcinomas papilíferos (KONDO et al. 2006; VASKO et al. 2003). Alguns argumentam que a presença da mutação do *RAS* em tumores benignos é um evento precoce na tumorigênese da tireoide (NAMBA et al. 1990). Sua prevalência em carcinoma papilífero da tireoide varia muito entre séries, sendo relativamente rara (0 a 16%) em carcinoma papilífero clássico (LAZZERESCHI et al. 1997; SUGG et al. 1999; NIKIFOROVA et al. 2003; VASKO et al. 2003) e mais freqüente (mais de 25%) em carcinomas papilíferos da tireoide variante folicular (ZHU et al. 2003; ADENIRAN et al. 2006; DI CRISTOFARO et al. 2006). As mutações associadas com tumores

de tireoide envolvem predominantemente o códon 61 dos genes *NRAS* e *HRAS* (VASKO et al. 2003; ZHU et al. 2003; DI CRISTOFARO et al. 2006). Genes *RAS*, notadamente o *NRAS*, são consistentemente mutados em tumores de tireoide pouco diferenciados. A prevalência de mutações do *RAS* varia entre 18 e 63% em carcinomas pouco diferenciados e entre 4 e 60% em carcinomas anaplásicos da tireoide (MANENTI et al. 1994; BASOLO et al. 2000; GARCIA-ROSTAN et al. 2003). Tais mutações estão associadas com tumor de fenótipo agressivo, de pior prognóstico (GARCIA-ROSTAN et al. 2003) e com o aparecimento de metástases hematogênicas, particularmente metástases ósseas (MANENTI et al. 1994; BASOLO et al. 2000).

Devido à associação encontrada entre mutações do *RAS* e prognóstico reservado em carcinomas de tireoide pouco diferenciados e anaplásicos, WANG et al. (2007) propõem que uma atenção especial deve ser dada aos carcinomas de tireoide bem diferenciados, particularmente o carcinoma folicular, que apresentam a mutação do *RAS* (HOU et al. 2007).

O gene *PIK3CA*, localizado no cromossomo 3q26.3, codifica uma subunidade catalítica p110 alfa de uma classe IA fosfatidilinositol 3`-quinase (PI3K) que é um componente da via PTEN/PI3K/AKT que regula processos celulares fundamentais relacionados a tumorigênese, incluindo progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, adesão, motilidade, capacidade de invasão e angiogênese (CANTLEY e NEEL 1999; SANSAL e SELLERS 2004). A via do PI3K está ativada em carcinomas da tireoide através da ativação constitutiva de moléculas estimulatórias (p.ex: *RAS*) e/ou pela perda

de expressão ou função inibitória da proteína PTEN resultando em ativação do AKT. O PTEN está frequentemente inativado (> 50%) dentre os carcinomas de tireoide de estágio avançado como nos carcinomas anaplásicos (DAHIA et al. 1997; HALACHMI et al. 1998; BRUNI et al. 2000; GIMM et al. 2000; WENG et al. 2001; FRISK et al. 2002) e a ativação do AKT está correlacionada com invasão e metástases tumorais (RINGEL et al. 2001; VASKO et al. 2004). Devido a perda de função do PTEN ser um passo crítico na progressão do câncer de tireoide, é razoável a hipótese que a ativação do PI3K através de mutações que levam a um ganho de função possam ter efeitos similares. De fato, recentemente tem sido relatado que mutações somáticas na subunidade catalítica do PI3K são comuns (25-40%) dentro de cânceres colo-retais, gástricos, mamários, ovarianos e tumores cerebrais de alto grau e que são encontradas principalmente nos exons 9 e 20 (BRODERICK et al. 2004; CAMPBELL et al. 2004; SAMUELS et al. 2004; LEE et al. 2005; LEVINE et al. 2005; SAAL et al. 2005).

A patogênese do câncer de tireoide envolve um espectro de eventos moleculares que deixam uma assinatura capaz de ser detectada. Esforços coordenados e intensos de pesquisa têm focado nestes marcadores de tumorigênese e são uma grande promessa para melhorar a acurácia de diagnóstico pré-operatório destes tumores. Uma técnica utilizada é a de c-DNA microarray onde centenas de genes são analisados com o objetivo de diferenciar processos não neoplásicos de neoplásicos benignos e malignos (FINLEY et al. 2005). Um estudo recente de expressão gênica identificou malignidade corretamente em 78 de 85 nódulos classificados como

suspeitos na citologia com 92% de sensibilidade e 52% de especificidade. Os valores preditivos negativos para as classes diagnósticas "atipia de significado indeterminado", "neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular", ou "Suspeito para malignidade" foram de 95%, 94%, e 85%, respectivamente (ALEXANDER et al. 2012).

O perfil de metilação do DNA é outro potencial marcador para diferenciar o câncer de tireoide de nódulos benignos. Quando cinco genes (CALCA, CDH1, TIMP3, DAPK, and RARbeta2) foram analisados, o método de detecção de metilação aberrante de DNA apresentou uma sensibilidade pré-operatória de detecção de câncer de tireoide de 68%, especificidade de 95%, acurácia de 77% e valor preditivo negativo de 60%. Entre os pacientes com PAAF indeterminada, a acurácia aumentou em 80% (HU et al. 2006).

Algoritmos clínicos atuais com o objetivo de identificar os nódulos com indicação cirúrgica permanecem com muitas imprecisões. Conforme a biologia molecular da carcinogênese da tireoide fica mais clara, biomarcadores mais sensíveis e mais específicos são revelados e poderão ser usados como adjuvantes de um melhor planejamento terapêutico e prognóstico de pacientes com nódulos de tireoide.

O pirosequenciamento tem sido considerado uma das técnicas mais sensíveis e rápidas para detecção de mutações genéticas pontuais. É um método que identifica o alelo mutante separadamente do alelo "wild-type" (selvagem) e pode detectar a mutação quando pequenas quantidades do alelo mutante estão presentes, como por exemplo, em material obtido por PAAF (JO et al. 2008). O pirosequenciamento é uma abordagem baseada

no monitoramento em tempo real da síntese do DNA. A reação de pirosequenciamento é catalisada por 4 enzimas: DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase. Após o anelamento do iniciador, a cada nucleotídeo incorporado, pela atividade da DNA polimerase, ocorre a liberação de fosfato inorgânico (PPi), substrato da ATP sulfúrilase para a produção de ATP. Este por sua vez reage com a luciferase produzindo luz, cuja intensidade é proporcional à quantidade de nucleotídeos incorporados. A apirase degrada os nucleotídeos não incorporados e o excesso de ATP (NORDSTROM et al. 2002; AGAH et al. 2004; AHMADIAN et al. 2006). Este método apresenta vantagens de custo e tempo sobre os métodos de sequenciamento convencionais e, portanto, pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico pré-operatório dos pacientes (KIM et al. 2008).

Embora todas estas vantagens sejam claras, o uso do pirosequenciamento não é uma rotina aplicada nas punções aspirativas e sua validação é de grande interesse clínico. No departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo este método já está padronizado em rotina para pesquisa de diversas mutações em outros tumores, inclusive a pesquisa das mutações de *BRAF* e *KRAS* em carcinomas do cólon.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar da punção aspirativa por agulha fina ser a ferramenta mais usada para a avaliação de nódulos tireoidianos, seu diagnóstico pré-operatório apresenta imprecisão em cerca de 20% de resultados (“suspeitos” ou “indeterminados”) o que leva um grande número de pacientes a uma cirurgia desnecessária. Por isso, outros métodos adjuvantes objetivos, de maior sensibilidade e especificidade, como a abordagem diagnóstica baseada em alterações moleculares, podem contribuir para uma melhor acurácia diagnóstica e planejamento terapêutico dos pacientes portadores de nódulos tireoidianos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a frequência das mutações dos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em espécimes de punção aspirativa por agulha fina e sua contribuição para análise pré-operatória de nódulos da glândula tireoide.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Implementar a técnica de pirosequenciamento para uso na rotina da investigação da pesquisa da mutação dos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em espécimes de punção aspirativa por agulha fina no Hospital A.C. Camargo;
2. Estudar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da pesquisa das mutações de *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* no material obtido por punção aspirativa de nódulos tireoidianos, tendo como grupos comparativos os casos de resultado indeterminado, os definitivamente benignos e os definitivamente malignos pelo critério citológico com o estudo histológico pareado dos espécimes de tireoidectomia;
3. Avaliar as características clínicas e anatomopatológicas dos tumores com mutações do *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA*;

4. Criar no serviço de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo um protocolo de análise de alterações moleculares em punções aspirativas por agulha fina indeterminadas que auxilie no diagnóstico pré-operatório e conduta dos nódulos tireoidianos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo com pacientes portadores de doença nodular da tireoide tratados no Hospital A.C. Camargo no período entre abril/2009 e julho/2011.

### **4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Pacientes de qualquer sexo e idade portadores de nódulos tireoidianos únicos ou múltiplos com indicação clínica de punção aspirativa;
- PAAF da glândula tireoide realizada nos serviços de Imagem ou Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo;
- Tireoidectomia total ou parcial realizada no Hospital A.C. Camargo.

### **4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- Material de PAAF considerado insatisfatório ou insuficiente para análise citopatológica;
- Indisponibilidade de material citológico excedente para a realização dos estudos moleculares;
- Indisponibilidade de espécime cirúrgico emblocado em parafina arquivado nas dependências do departamento de Anatomia

Patológica do Hospital A.C. Camargo;

- Casos com DNA insuficiente por quantidade e/ou qualidade para realização dos testes moleculares.

### **4.3 AMOSTRAS**

#### **4.3.1 Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)**

As amostras citológicas foram obtidas seguindo procedimento padronizado, usando seringas com agulhas de 22 a 27 gauge em até no máximo quatro repetições por nódulo com indicação clínica de punção para os pacientes encaminhados ao setor de Imagem do Hospital A.C. Camargo. Nódulos tireoidianos de pacientes com PAAF em outro serviço e cirurgia no Hospital AC Camargo foram puncionados nos espécimes cirúrgicos (ex vivo) encaminhados para exame intra-operatório no departamento de Anatomia Patológica, seguindo procedimento mais próximo possível da coleta in-vivo. Todos os aspirados foram conservados em fixador específico (ThinPrep®; Cytoc Corporation, Marlborough, MA) e as lâminas preparadas segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. Este método de conservação é amplamente utilizado no mundo para exames citopatológicos da tireoide, com a vantagem de conservar a morfologia das células para o diagnóstico e também a qualidade do DNA (STAMATAKI et al. 2008). O frasco contém 20 ml de conservante e apenas uma parte deste foi utilizado para a preparação de uma lâmina em monocamada em equipamento específico, para o estudo diagnóstico. Após o diagnóstico rotineiro, o excedente da amostra foi

estocado em geladeira entre 2 e 7 °C para extração do DNA e para a pesquisa da mutação dos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* sem a necessidade de uma coleta adicional.

Para identificação precisa dos nódulos previamente puncionados em serviço externo, foram também utilizados dados de exames ultrasonográficos e laudos citopatológicos externos referentes ao(s) nódulo(s) em estudo presentes nos prontuários dos pacientes.

#### **4.3.2 Citologia**

Os esfregaços foram avaliados por ocasião do diagnóstico citológico da rotina do laboratório de patologia e arquivados. Posteriormente, todas as lâminas foram resgatadas do arquivo do departamento de Anatomia Patológica, revistas pelo aluno (A.L.D) e classificadas de acordo com o Sistema Bethesda para diagnósticos citopatológicos de tireoide (CIBAS et al. 2009) na seguintes categorias:

- I. Não diagnóstico/Insatisfatório
- II. Benigno
- III. Atipia de significado indeterminado ou Lesão folicular de significado indeterminado
- IV. Neoplasia folicular ou Suspeito para neoplasia folicular
- V. Suspeito para malignidade
- VI. Maligno

Os casos com diagnósticos divergentes entre rotina e revisão foram submetidos à consulta do orientador (V.P.A) e classificados de maneira

consensual. O espécime foi qualificado como satisfatório na presença de ao menos 6 grupos de células epiteliais com no mínimo 10 células por grupo (GOELLNER et al. 1987; GRANT et al. 1989). Os pacientes com citologia indeterminada foram objeto principal deste estudo (casos), e nódulos benignos e malignos à PAAF (controles) foram incluídos para cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos. Como apenas raramente pacientes portadores de nódulos benignos são encaminhados para cirurgia, os nódulos benignos presentes em espécimes de tireoidectomia por nódulo maligno ou indeterminado contribuíram para compor o grupo de nódulos benignos.

#### **4.3.3 Histologia**

Todos os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina tamponada 10% por um tempo entre 12 e 48 horas e encaminhados ao departamento de Anatomia Patológica para processamento histológico e inclusão em blocos de parafina seguindo procedimento padrão do departamento de Anatomia Patológica.

Os blocos de parafina foram então submetidos a recortes de 5 micrômetros de espessura, corados em hematoxilina-eosina (HE) para preparo das lâminas e exame histológico. Os aspectos cito-arquiteturais de cada caso foram avaliados pelo patologista responsável pela liberação do caso. Posteriormente, todos os blocos e lâminas foram resgatados do arquivo do departamento de Anatomia Patológica, sendo realizados novos cortes histológicos para este estudo que foram então revistos pelo aluno

(A.L.D.) para a classificação histológica segundo critérios da OMS (2004) (Anexo 1). Os casos com diagnósticos divergentes entre o resultado oficial e a revisão foram reavaliados pelo orientador (V.P.A) e classificados de maneira consensual. O estadiamento foi realizado de acordo com a sétima edição da Classificação de Tumores Malignos segundo o *American Joint Committee on Cancer AJCC* (EDGE et al. 2010) (Anexo 2).

#### **4.3.4 Dados clínicos**

Os dados clínicos foram coletados por meio de consulta aos prontuários em colaboração com o Departamento de Cabeça e Pescoço do Hospital A.C. Camargo seguindo um Protocolo de Avaliação Clínica de pacientes portadores de Doença Nodular Tireoidiana elaborado para este estudo (Anexo 3).

#### **4.3.5 Extração de DNA dos espécimes citológicos**

As lâminas de citologia preparadas através do método “*Thinprep*” do material remanescente de punção foram raspadas e o DNA extraído utilizando-se QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen®) segundo o protocolo sugerido pelo fabricante (Anexo 4). A quantificação foi feita utilizando-se 1µl de DNA no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) em comprimento de onda 260/280 e 260/230 e a qualidade do DNA foi checada em gel de agarose.

#### **4.3.6 Extração de DNA dos espécimes cirúrgicos emblocados em parafina**

Foram realizados cortes histológicos dos blocos de parafina fixados em lâminas silanizadas (08 lâminas com 5-10 µm de espessura para cada bloco) que foram estocadas a -20°C. Posteriormente, realizou-se a desparafinização e extração do DNA seguindo o protocolo específico sugerido no kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen®) para material fixado em formalina e emblocado em parafina (Anexo 5). A quantificação foi feita utilizando-se 1µl de DNA no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) em comprimento de onda 260/280 e 260/230 e a qualidade do DNA foi checada em gel de agarose.

#### **4.4 AVALIAÇÃO DO GENE *BRAF***

O ensaio foi desenvolvido para a genotipagem do códon 600 (exon 15) do gene *BRAF* (Human v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) localizado no cromossomo 7 para avaliação da transversão de uma timina (T) por uma adenina (A).

##### **4.4.1 Sequência exônica (exon 15 - gene *BRAF*)**

```
TATRTAGGCTAAATAGAACTAATCATTGTTTTAGACATACTTATTG
ACTCTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATGTTTTAAAGAATATTATATTACA
GAATTATAGAAATTAGATCTCTTACCTAACCTTCATAATGCTTGCTCTG
ATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGATAT
```

ATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAWAGGTGATTTTGGTCTAGCT  
 ACAGT/A GAAACTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCT  
 GGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTTCCACTGATNA  
 AATTTTGGCCCTGAGATGCTGCTGAGTTACTAGAAAGTCTTGAAGGTC  
 TCAACTATAGTATTTTCATAGTTCCCYGTATTCACAAAATCAGTGTTCT  
 TATTTTTATGTAAATAGATTTTTTAACTTTTTTCTTTACCCTTAAAACGAA  
 TATTTT

Destaques:

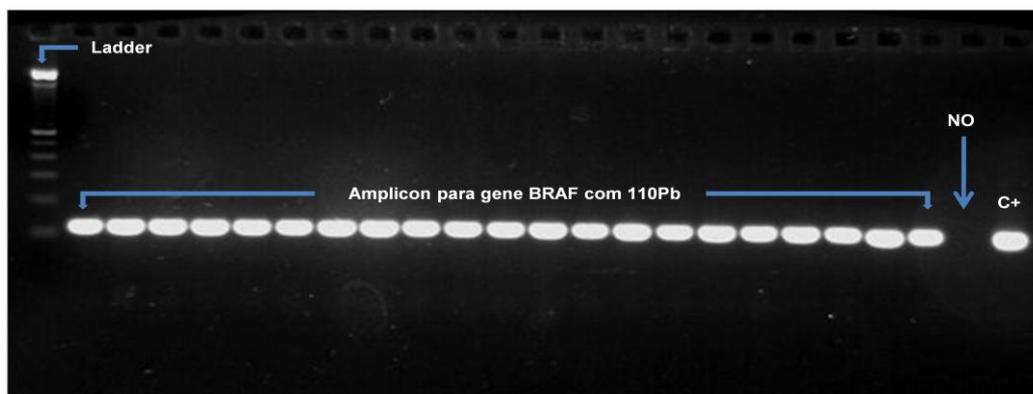
- **T/A** (rs113488022): mutação alvo

A mutação alvo (rs113488022) foi analisada utilizando-se os primers ADS871 (EpigenDx®). A seleção de primers para a amplificação específica de fragmentos do gene *BRAF* foi realizada tendo como base os registros sobre seqüências de genes depositadas no banco de dados do GenBank (BENSON et al. 2011).

#### 4.4.2 PCR - *BRAF*

Cada reação de PCR continha 1-5 ng de DNA genômico (Tabela 2). Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 94°C por 5 min, 45 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 30 s, 72°C por 30 s, e finalmente 5 min à 72°C. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon em um gel de agarose a 2% (Figura 3) contendo 2g de agarose ultrapura (Invitrogen) para cada 100 ml de tampão TBE 0,5X cuja composição em solução 10X foi a seguinte: Tris

(CAS# 37186) 107,81 g/l (0,89 M), EDTA (CAS# 60004) 5,8 g/l (0,02 M) e Ácido bórico (CAS# 11280) 55,0 g/L (0,89 M). Após amplificação confirmada, os produtos foram submetidos à reação de pirosequenciamento.



**Figura 3** - Gel de agarose 2% de amostras de DNA amplificadas por PCR para o gene *BRAF*.

**Tabela 2** - Protocolo - PCR para *BRAF* com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.

COMPONENTE	Quantidade(15 µl)
10X tampão - PCR (15mM MgCl <sub>2</sub> )	1,5 µl (1X)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0 µl (1,5 mM conc. final)
10 mM dNTPs	0,3 µl (200 µM cada)
10 µM ADS871FPB	0,3 µl (3 pmol)
2,5 µM ADS871RP	0,3 µl (3 pmol)
HotStar Taq Polymerase (5 U/µl)	0,09 µl (0,75 U)
DNA	4 µl de DNA genômico
H <sub>2</sub> O	Ajustar para 15 µl

## 4.5 AVALIAÇÃO DO GENE *NRAS*

O ensaio foi desenvolvido para genotipagem dos códonos 12, 13 (exon 2) e 61 (exon 3) do gene *NRAS* (Human neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) localizado no cromossomo 1 para avaliação das seguintes alterações: GGT > NNT (códonos 12 e 13) e CAA > CNA (códon 61).

### 4.5.1 Sequência exônica (exons 2 e 3 - gene *NRAS*)

GAAACGTCCCGTGTGGGAGGGGCGGGTCTGGGTGCGGCTGCCGCAT  
 GACTCGTGGTTCGGAGGCCACGTGGCCGGGGCGGGGACTCAGGCG  
 CCTGGCAGCCGACTGATTACGTAGCGGGCGGGGCCAAGTGCCGCTCC  
 TTGGTGGGGGCTGTTTCATGGCGGTTCCGGGGTCTCCAACATTTTTCCC  
 GGTCTGTGGTCCTAAATCTGTCCAAAGCAGAGGCAGTGGAGCTTGAGG  
 TTCTTGCTGGTGTGAAATATGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGGAGCA**G/**  
**CGTG/CG/T/A**TGTTGGGAAAAGCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAA  
 CCACTTTGTAGATGAATATGATCCCACCATAGAGGATTCTTACAGAAAA  
 CAAGTGGTTATAGATGGTGAAGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAG  
 ATGGTGAAACCTGTTTGGTGGACATCTGGATACAGCTGGA**CA/T/GA**GAA  
 GAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCGAAGGCTTC  
 CTCTGTGTATTTGCCATCAATAATAGCAAGTCATTTGCGGATATTAACCT  
 CTACAGGGAGCAGATTAAGCGAGTAAAGACTCGGATGATGTACCTATG  
 GTGCTAGTGGGAAACAAGTGGATTTGCCAACAAGGACAGTTGATACAA  
 AACAAGCCCACGAACTGGCCAAGAGTTACGGGATTCCATTGAAA  
 CCTCAGCAAGACCAGACAGGGTGTGGAAGATGCTTTTTACACACTGGTA

AGGAAATACGCCAGTACCGAATGAAAAAACTCAACAGCAGTGATGATG  
GGACTCAGGGTTGTATGGGATTGCCATGTGTGGTGTGTAACAAGATAC  
TTTTAAAGTTTTGTCAGAAAAGAGCCACTTTCAGCTGCACTGACACCCT  
GGTCCTGACTTCCTGGAGGAGAAGTATTCCTGTTGCTGTCTTCAGTCTC  
ACAGAGAAGCTCCTGTACTTCCCCAGCTCTCAGTAGT

Destaques:

- **G/CGTG/CG/T/A**: códon 12 e 13
- **CAT/GA**: códon 61

Os códons 12 e 13 foram analisados utilizando-se o primer ADS213 e o códon 61 com o primer ADS214 (EpigenDx®). A seleção de primers para a amplificação específica de fragmentos do gene *NRAS* foi realizada tendo como base os registros sobre seqüências de genes depositadas no banco de dados do GenBank (BENSON et al. 2011).

#### 4.5.2 PCR - *NRAS*

Cada reação de PCR continha 1-5 ng de DNA genômico (Tabela 3). Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 95°C por 15 min, 45 ciclos de 95°C por 15 s, 58°C por 30 s, 72°C por 30 s, e finalmente 5 min à 72°C. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon em um gel de agarose a 2% contendo 2g de agarose ultrapura (Invitrogen) para cada 100 ml de tampão TBE 0,5X cuja composição em solução 10X foi a seguinte: Tris (CAS#

37186) 107,81 g/l (0,89 M), EDTA (CAS# 60004) 5,8 g/l (0.02 M) e Ácido bórico (CAS# 11280) 55,0 g/L (0,89 M). Após amplificação confirmada, os produtos foram submetidos à reação de Pirosequenciamento.

**Tabela 3** - Protocolo - PCR para *NRAS* com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.

COMPONENTE	Quantidade(30 µl)
10X tampão - PCR (15mM MgCl <sub>2</sub> )	3,0 µl (1X)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8 µl
10 mM dNTPs	0,6 µl
10 µM ADS213/ADS214FP	0,3 µl (3 pmol)
2,5 µM ADS213/ADS214RPT	0,12 µl (0,3 pmol)
10 µM Univ RPB	0,27 µl (2,7 pmol)
HotStar Taq Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl
DNA	1 µl de DNA genômico
H <sub>2</sub> O	Ajustar para 30 µl

## 4.6 AVALIAÇÃO DO GENE *HRAS*

O ensaio foi desenvolvido para genotipagem dos códons 12, 13 (exon 2) e 61 (exon 3) do gene *HRAS* (Human v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) localizado no cromossomo 11 para avaliação de trocas de resíduos de aminoácidos de glicina para alanina e outros, GGCGGT>NNCNGT (códons 12 e 13) e CAG>NNN (códon 61).

### 4.6.1 Sequência exônica (exons 2 e 3 - gene *HRAS*)

```

gggggcgaggcgacagccctcccgcacgctggggtgcagctgcacaggtaggcagctgca
gtccttgctgctggcgtggggcccagggaccgctgtgggttgccctcagatggccctgccaggctgcc

```

ctgtggggcctggggcctgggcctggcctggctgagcagggccctcctggcagGTGGGGCAGG  
 AGACCCTGTAGGAGGACCCCGGGCCGCAGGCCCYTGAGGAGCGATGA  
 CGGAATATAGCTGGTGGTGGTGGGCGCC**G/AGCGGT**GTGGGCAAGAG  
 TGCGCTGACCATCCAGCTGATCCAGAACCATTTTGTGGACGAATACGA  
 CCCCACTAT[T]AGAGgtgagcctggcgccRccgtccaggtgccagcagctgctgcgggcgag  
 cccaggacacagccaggatagggctggctgcagcccctggcccctgcatgggtgctgtggccctgtctcc  
 tgcttctctagaggaggggagtcctcgtctcagcaccacccaggagaggagggggcatgaggggcatga  
 gaggtaccaggagagggcggctgtgtgaactccccacggaaggtcctgagggggtcctgagcctgt  
 cctGATTCCTACCGGAAGCAGGTGGTCATTGATGGGGAGACGTGCCTGT  
 TGGACATCCTGGATACCGCCGGC**CAG**GAGGAGTACAGCGCCATGCGG  
 GACCAGTACATGCGCACCGGGGAGGGCTTCCTGTGTGTGTTTGCCATC  
 AACAAACACCAAGTCTTTTGAGGACATCCACCAGTACAG

Destaques:

- **GGCGGT**: códons 12 e 13
- **CAG**: códon 61
- Sequência em letra minúscula: intron
- Sequência em letra MAIÚSCULA: exon 2 e 3

Os códons 12 e 13 foram analisados utilizando-se o primer ADS2103 e o códon 61 com o primer ADS2293 (EpigenDx®). A seleção de primers para a amplificação específica de fragmentos do gene *HRAS* foi realizada tendo como base os registros sobre seqüências de genes depositadas no banco de dados do GenBank (BENSON et al. 2011).

#### 4.6.2 PCR- *HRAS*

Cada reação de PCR continha 1-5 ng de DNA genômico (Tabela 4). Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 94°C por 2 min, 45 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s, 72°C por 30 s, e finalmente 5 min à 72°C. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon em um gel de agarose a 2% contendo 2g de agarose ultrapura (Invitrogen) para cada 100 ml de tampão TBE 0,5X cuja composição em solução 10X foi a seguinte: Tris (CAS# 37186) 107,81 g/l (0,89 M), EDTA (CAS# 60004) 5,8 g/l (0,02 M) e Ácido bórico (CAS# 11280) 55,0 g/L (0,89 M) . Após amplificação confirmada, os produtos foram submetidos à reação de pirosequenciamento.

**Tabela 4** - Protocolo - PCR para *HRAS* com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.

COMPONENTE	Quantidade(30 µl)
10X tampão - PCR (15mM MgCl <sub>2</sub> )	3,0 µl (1X)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8 µl
10 mM dNTPs	0,6 µl
10 µM ADS2103/2293FP	0,6 µl (6 pmol)
10 µM ADS2103/2293RPB	0,6 µl (6 pmol)
HotStar Taq Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl
DNA	1 µl de DNA genômico
H <sub>2</sub> O	Ajustar para 30 µl

## 4.7 AVALIAÇÃO DO GENE *KRAS*

O ensaio foi desenvolvido para genotipagem dos códons 12 e 13 (exon 2) do gene *KRAS* (Human v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) localizado no cromossomo 12 para avaliação das seguintes alterações: GGTGGC > GNTGNC.

### 4.7.1 Sequência exônica (exon 2 – gene *KRAS*)

tctcatctgattcttactgttaatatttatccaagagaactactgccatgatgctttaaagttttctgta  
gctgttgcattgacttctaacttagaggtgggggtccactaggaaaactgtcaataagagtggagat  
agctgtcagcaactttgtgaggtgtgctacaggggtgtagagcactgtgaagtctctacatgagtgaagtc  
atgatatgatccttgagagccttagccgccgagaaagcagctctggctatttagatagaacaactgatttt  
aagataaaagaactgtctatgtagcatttatgcattttcttaagcgtcgatggaggagtttgtaaataagta  
cagttcattacgatacagtctgcagtcaactggaattttcatgattgaattttgtaaggattttgaaataattttc  
atataaaggtagttgtattaaaggtagtggggagatttgatagtgatttaaccttatgtgtacatgttctaa  
tatagtcacattttcattattttattataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTG  
TGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGC  
TAATTCAGAATCATTGTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGgtaaatctt  
gttttaatatgcatattactggtgcaggaccattcttgatacagataaaggtttctctgaccattttcatgagta  
ctatacaagataattatgctgaaagttaagttatctgaaatgtacctgggttcaagttatgtaaccattaa  
tatgggaactttacttctgggagatgtcaggggtccatgatgttcactctctggcattttgattggaagtgtat  
ttcagagtttctgagagggtagaaattgtatcctatctggacctaaaagacaatcttttattgtaactttattt  
tatgggttcttggtatttgacatcaatgtaaagggttagatttaattgtactagtgaatatataattggtgatggtt  
gattttttaaacttcatca

Destaques:

- **GGTGGC**: códons 12 e 13
- Sequência em letra minúscula: intron
- Sequência em letra MAIÚSCULA: exon 2

Os códons 12 e 13 foram analisados utilizando-se o primer ADS747 (EpigenDx®). A seleção de primers para a amplificação específica de fragmentos do gene *KRAS* foi realizada tendo como base os registros sobre seqüências de genes depositadas no banco de dados do GenBank (BENSON et al. 2011).

#### 4.7.2 PCR - *KRAS*

Cada reação de PCR continha 1-5 ng de DNA genômico (Tabela 5). Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 94°C por 2 min, 45 ciclos de 94°C por 30 s, 64°C por 30 s, 72°C por 30 s, e finalmente 5 min à 72°C. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon em um gel de agarose a 2% contendo 2g de agarose ultrapura (Invitrogen) para cada 100 ml de tampão TBE 0,5X cuja composição em solução 10X foi a seguinte: Tris (CAS# 37186) 107,81 g/l (0,89 M), EDTA (CAS# 60004) 5,8 g/l (0,02 M) e Ácido bórico (CAS# 11280) 55,0 g/L (0,89 M) . Após amplificação confirmada, os produtos foram submetidos à reação de pirosequenciamento.

**Tabela 5** - Protocolo - PCR para *KRAS* com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.

COMPONENTE	Quantidade(30 µl)
10X tampão - PCR (15mM MgCl <sub>2</sub> )	3,0 µl (1X)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,8 µl
10 mM dNTPs	0,6 µl
10 µM ADS747FP	0,6 µl (6 pmol)
10 µM ADS747RPB	0,6 µl (6 pmol)
HotStar Taq Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl
DNA	1 µl de DNA genômico
H <sub>2</sub> O	Ajustar para 30 µl

## 4.8 AVALIAÇÃO DO GENE *PIK3CA*

O ensaio foi desenvolvido para a avaliação das mais frequentes mutações nos exons 9 e 20 do gene *PIK3CA* (Human phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide). Foram analisadas as seguintes alterações:

- Exon 9: 1582A>G, 1624G>A, c1633G>A, 1634A>G, 1636C>A
- Exon 20: 3075C>T, 3129G>T, 3133G>A, 3136G>A, 3139C>T, 3140A>G>T

### 4.8.1 Sequência exônica *PIK3CA*

#### ➤ Exon 9

tgtcttagattggttctttcctgtctctgaaaataaagtcttgcaatgaaaataaattattttacaacagt  
 taattagcaatgtaaaattattgaaaatgtatttgcttttctgtaaatcatctgaatccagaggggaaaaatat  
 gacaaagaaagctatataagatattttattttacagAGTAACAGACTAGCTAGAGACAAT  
 GAATTAAGGGAAAATGAC**R**AAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTAACGAGA  
 TCCTCTCTCT**G**AAATCACT**GAGC**AGGAGAAAGATTTTCTATGGAGTCAC

AGgtaagtgctaaaaatggagattctctgtttcttttctttattacagaaaaataactgaattggctgattcag  
 catgttttaccatacctattggaataaataaagcagaatttacatgatttttaactataaacattgccttttaa  
 aaacaatggfttaaattgatatttgggaaaatcactactacattgtagttggcacattaaatgcttttctactctg  
 aattcctgatatgactttcttaggattgtttaaaatattctagtagtttaggtcaattagatgtg

Destaques:

- **Letra:** mutação 1582A>G
- **Letra:** mutação 1624G>A
- **Letra:** mutação c1633G>A
- **Letra:** mutação 1634A>G
- **Letra:** mutação 1636C>A
- Sequência em letra minúscula: intron
- Sequência em letra MAIÚSCULA: exon 9

O exon 9 foi avaliado utilizando-se o primer ADS019 (EpigenDx®). A seleção de primers para a amplificação específica de fragmentos do gene *PIK3CA* foi realizada tendo como base os registros sobre seqüências de genes depositadas no banco de dados do GenBank (BENSON et al. 2011).

#### ➤ **Exon 20**

catttttggtcatacactttgaggaaagtcagtcaccataatcacctgtttattcataactttttacc  
 accttatggtatctcattagactatatcagactttaagctttttacaatcttataaaattctgctttgtctaca  
 cacagtcctgactctagcttaagcacaaggatttagtatgaaccaattcatacatttaactattaaact  
 cctgacatgccaggcattgtttaggtgcgtaataaagcagttttaaaagtccttattctctgaagttaca  
 ttctagtggggtaaagggaatcaaagatgttgtaagagaagtgagagaggaatgctattttttatagctt  
 tgtctacaagcctctctaattttgtgacatttgagcaaagacctgaaggatttaacatcatttgctccaaactg

accaaactgttcttattacttatagGTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGCTTATCTAGC  
 TTTCACAGCATGCCAATCTCTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCTTGGC  
 TCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTTCGAAA  
 GACYCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAGAGGCTTTGGAGTATTTTCATGA  
 AACAAATGTAATGAAATGACACTAAGTTTCATGGTGGCTGGACAACAAAA  
 ATGGATTGGATCTTCCACACAATTAACAGCATGCATTGAACTGAAAAG  
 ATAACTGAGAAAATGAAAGCTCACTCTGGATTCCACACTGCACTGTTAA  
 TAACTCCAGCGGCAAAGACCGATTGCATAGGAATTGCACAATCCATGAA  
 CAGCATTAGAATTTACAGCAAGAACAGAAATAAAATACTATATAATTTAA  
 ATAATGTAAACGCAAACAGGGTTTGATAGCACTAAACTGTTTCATTTCAA  
 ATTAAGCTTTAGAATAATGCGCAATTTTCATGTTATGCCTTAAGTCCAAAA  
 AGGTAAACTTTGAAGATTGTTTGTATCTTTTTTTAAAAACAAAACAAAAC  
 AAAAATCCCAAATTATAGAAATGATGGAGAAGGAAAAAGTGATKGTTTT  
 TTTTGTCTTGCAAATGTTCTATGTTTTGAAATGTGGACACAACAAAGGCT  
 GTTATTGCATTAGGTGTAAGTAAACTGGAGTTTAGTTAAATTACATTGAT  
 TGGAAAAGAATGAAAATTTCTATTTTTCCATTGCTGTTCAATTTATAGTT  
 TGAAGTGGGTTTTTGACGCTTGTTAATGAAGAAAATGCTTGGGGTGG  
 AAGGGACTCTGA

Destaques:

- **Letra:** mutação 3075C>T
- **Letra:** mutação 3129G>T
- **Letra:** mutação 3133G>A
- **Letra:** mutação 3136G>A
- **Letra:** mutação 3139C>T

- **Letra:** mutação 3140A>G>T
- **Sequência em letra minúscula:** intron
- **Sequência em letra MAIÚSCULA:** exon 20

O exon 20 foi avaliado utilizando-se o primer ADS020RS (EpigenDx®). A seleção de primers para a amplificação específica de fragmentos do gene *PIK3CA* foi realizada tendo como base os registros sobre seqüências de genes depositadas no banco de dados do GenBank (BENSON et al. 2011).

#### **4.8.2 PCR – *PIK3CA***

Cada reação de PCR continha 1-5 ng de DNA genômico (Tabela 6). Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 95°C por 15 min, 45 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s, e finalmente 5 min à 72°C. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon em um gel de agarose a 2% contendo 2g de agarose ultrapura (Invitrogen) para cada 100 ml de tampão TBE 0,5X cuja composição em solução 10X foi a seguinte: Tris (CAS# 37186) 107,81 g/l (0,89 M), EDTA (CAS# 60004) 5,8 g/l (0,02 M) e Ácido bórico (CAS# 11280) 55,0 g/L (0,89 M) . Após amplificação confirmada, os produtos foram submetidos à reação de pirosequenciamento.

**Tabela 6** - Protocolo - PCR para *PIK3CA* (exons 9 e 20) com distribuição dos componentes e suas respectivas quantidades.

COMPONENTE	Quantidade(15 µl)
10X tampão - PCR (15mM MgCl <sub>2</sub> )	1,5 µl (1X)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,9 µl
10 mM dNTPs	0,3 µl
10 µM ADS019/20FPB	0,3 µl
10 µM ADS019/20RP	0,3 µl
HotStar Taq Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl
DNA	1 µl de DNA genômico
H <sub>2</sub> O	Ajustar para 15 µl

#### 4.9 PIROSSEQUENCIAMENTO

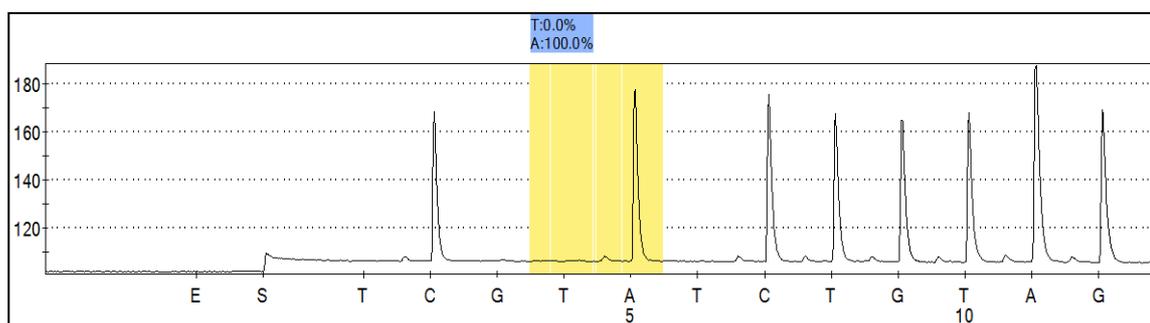
A preparação da fita simples de DNA para o pirosequenciamento foi realizada através do PSQ Vacuun Prep Tool (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Vinte e cinco µl do produto de PCR foram imobilizados em esferas de sefarose recobertas por estreptavidina. (Streptavidin Sepharose High Performace, GE Healthcare).

Em uma placa de 96 *wells* foram transferidos 25 µl do produto amplificado por PCR e adicionados 55 µl da mistura contendo as esferas de sefarose (3 µl da solução contendo as esferas de sefarose, 40 µl de tampão de ligação e 15 µl de água deionizada) em cada well. A placa foi agitada por 15 min a 1350 rpm e em seguida levada à bomba de vaco (Vacuun Presp Toll), onde o produto de PCR ligado às esferas foi precipitado com álcool 70%, desnaturado e lavado nos respectivos tampões.

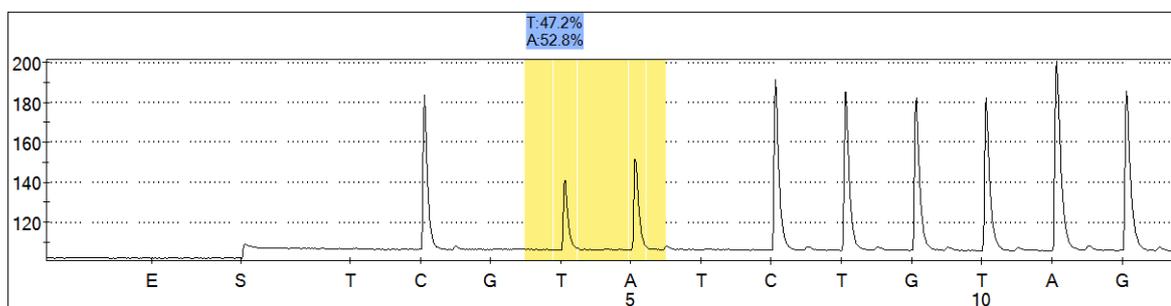
Em seguida os produtos purificados foram incubados com 0,4 µmol/L de iniciadores do sequenciamento (*primers*), previamente diluídos em 38,6

µl de tampão de anelamento, à 80°C por 2 min em placa de sequenciamento (PSQ 96 plate), 5 minutos na placa aquecedora e 5 minutos em temperatura ambiente.

Os produtos purificados ligados aos iniciadores de sequencia foram transferidos a base do PSQ HS 96 A Pyrosequencer (Qiagen, Valencia, CA). A reação de síntese por sequenciamento da fita complementar foi realizada automaticamente pelo instrumento PyroMark MD (Biotage) em temperatura ambiente usando reagentes PyroGold (Biotage). O sinal emitido durante a incorporação de cada nucleotídeo foi detectado por uma câmera CCD e convertido em picos para formar o pirograma (Figuras 4 e 5).



**Figura 4** - Pirograma com análise quantitativa de incorporação de nucleotídeos. Exemplo de amostra wild type (mutação *BRAF* negativa).



**Figura 5** - Pirograma com análise quantitativa de incorporação de nucleotídeos. Exemplo de amostra com mutação *BRAF* positiva.

A mutação foi considerada presente quando na análise quantitativa gerada pelo pirosequenciador detectava-se um valor acima de 15% (“*cut off*” estabelecido e validado por meio de experimento com diluições progressivas entre cultura de células portadoras de mutação e selvagens realizado pelo departamento de Biologia Molecular do Hospital A.C.Camargo para os casos da rotina hospitalar avaliados pelo pirosequenciador Q96).

## **5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados de cada caso foram incorporados em planilhas contendo as variáveis clinico-patológicas investigadas neste estudo. A frequência das mutações foram descritas nos diversos grupos e a análise estatística foi realizada no software GraphPrims v 5.0a usando os testes do qui-quadrado ou exato de Fisher para as variáveis categóricas considerando o nível de significância de 5%. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo para cada uma das mutações foram avaliadas considerando os controles negativos e positivos presentes no estudo.

## 6 RESULTADOS

Foram inicialmente selecionados 152 pacientes portadores de um total de 193 nódulos de tireoide no período entre abril de 2009 e julho de 2011. Destes, foram excluídos 52 pacientes/86 nódulos pelos seguintes motivos: indisponibilidade do espécime cirúrgico (53 casos), material citológico inadequado ou insuficiente (26 casos), baixa qualidade e/ou quantidade de DNA extraído (4 casos), ausência ou erro de identificação nos espécimes citológicos (2 casos), ausência dos blocos de parafina nas dependências do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo (1 caso). Foram então definitivamente incluídos para o estudo 100 pacientes portadores de 107 nódulos avaliados em dois espécimes pareados (citológico x cirúrgico) somando um total de 214 espécimes.

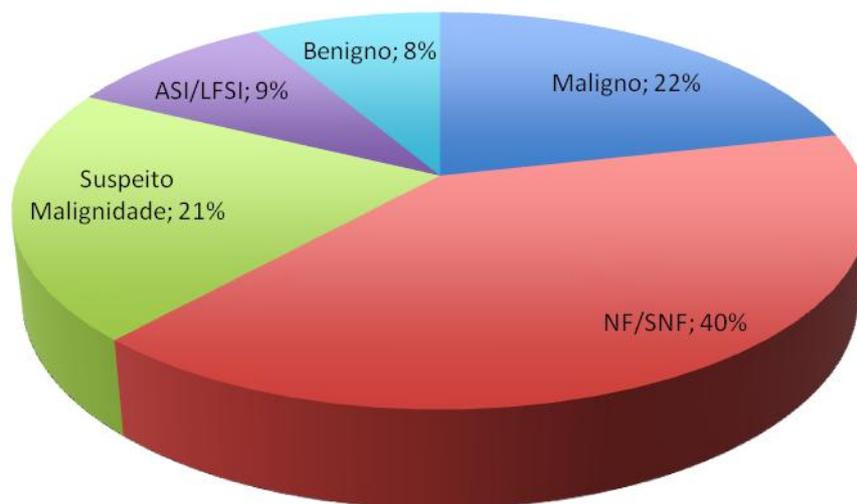
A idade dos pacientes variou entre 10 e 96 anos (média: 45,81 anos) sendo que 53% possuíam até 45 anos (Tabela 7).

Em relação ao gênero houve um predomínio do sexo feminino que correspondeu a 80% dos pacientes. Quarenta e dois pacientes (42%) relataram histórico familiar de câncer sendo que 10% eram da glândula tireoide. Doze pacientes relataram antecedentes de neoplasia dos quais 5 (42%) eram de mama. Os outros sítios primários foram: cólon, laringe, seios da face, próstata, parótida e pele. A maioria (86%) dos pacientes não possuía histórico de exposição à radiação prévia. Em relação ao perfil funcional tireoidiano, 12% dos pacientes relataram hipotireoidismo e não houve nenhum relato de hipertireoidismo.

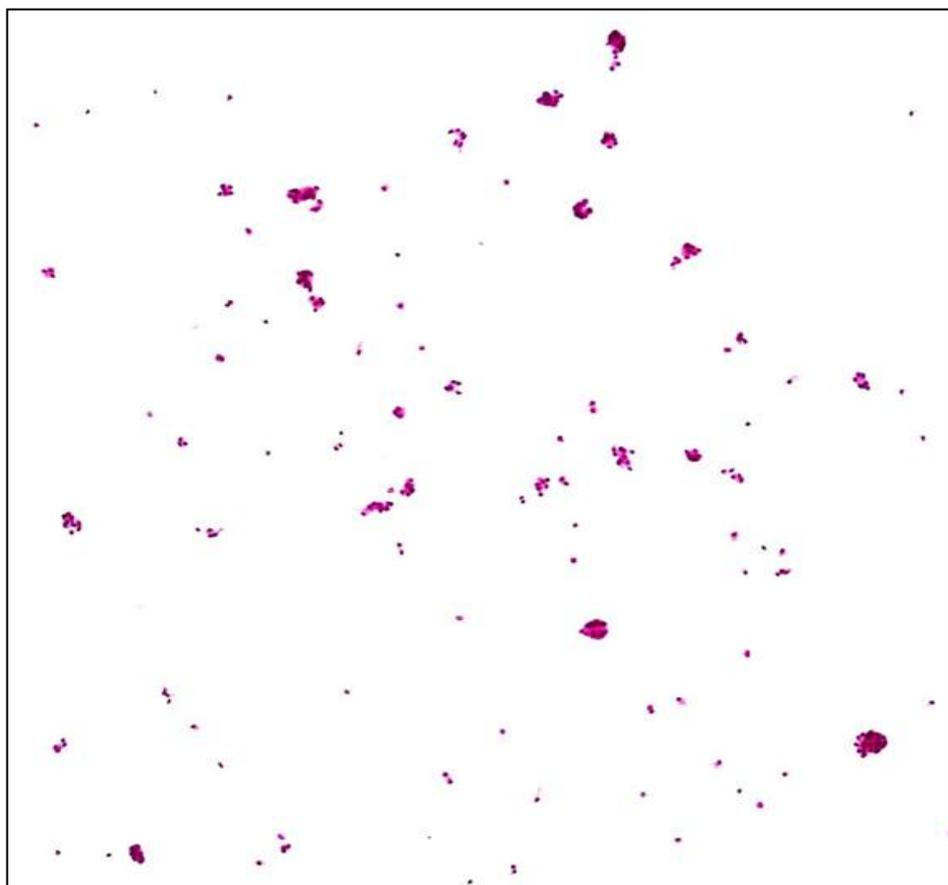
**Tabela 7** - Frequência por variáveis clínicas e histopatológicas

Variável		n(%)
<b>Gênero (n=100)</b>	Masculino	20(20)
	Feminino	80 (80)
<b>Idade (n=100)</b>	até 45 anos	53 (53)
	>45 anos	47 (47)
<b>Tireoidite (n=100)</b>	Sim	34 (34)
	Não	66 (66)
<b>Tamanho do Nódulo (n=107)</b>	até 1,0 cm	53 (49,5)
	1 a 4 cm	52 (48,6)
	> 4cm	02 (1,9)
<b>Invasão Extra-tiroidiana (n=71)</b>	Sim	09 (12,7)
	Não	62(87,3)
<b>Invasão vascular (n=71)</b>	Sim	7(9,8 )
	Não	64 (90,2)
<b>Metástase Linfonodal (n=13)</b>	N0	04 (30,7)
	N1a	05 (38,6)
	N1b	04 (30,7)
<b>Antecedente Neoplásico (n=100)</b>	Sim	12 (12)
	Não	88 (88)
<b>História Familiar (n=100)</b>	Não	48 (48)
	Tireoide	08 (08)
	Outros	32 (32)
	Tireoide + outro	02 ( 02)
	Não informado	10 (10)

Foram avaliados um total de 107 nódulos tireoidianos incluindo tanto os espécimes citológicos obtidos por PAAF quanto os espécimes cirúrgicos emblocados em parafina. O tamanho dos nódulos variou entre 0,3 e 8 cm (média: 1,2 cm) sendo que 49,5% dos nódulos mediram até 1cm (Tabela 6). Os pacientes eram portadores de tireoidite de Hashimoto em 34% dos casos. Dentre os diagnósticos citológicos 75 (70%) apresentavam resultado indeterminado. Destes, 10 eram ASI/LFSI (III), 43 NF/SNF (IV) (Figura 7) e 22 Suspeitos para malignidade (V). Dentre os 32 casos restantes, 09 eram da classe Benigno e 23 Malignos (Figura 6).

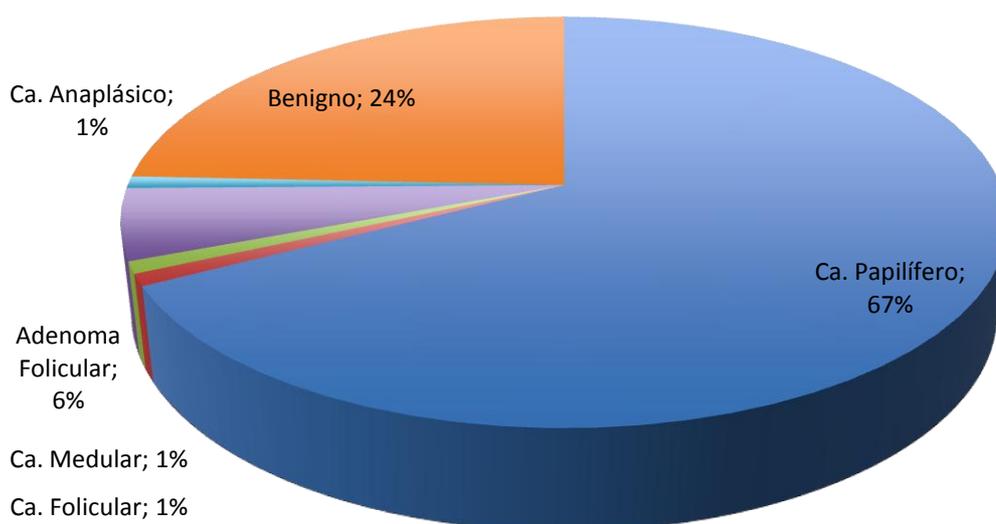


**Figura 6** - Frequência entre as classes de diagnóstico citológico



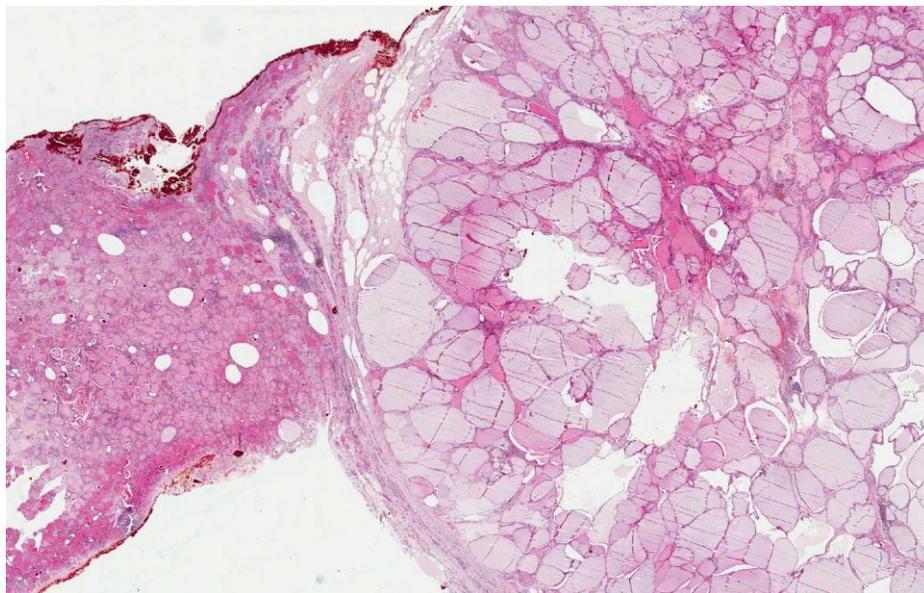
**Figura 7** - Exemplo de citologia classificada como NF/SNF (IV). Caso nº 110. aumento 10x

Dentre os diagnósticos histológicos, 32 eram benignos (Figura 8). Dos benignos, 26 eram bócios coloides (Figura 9) associados ou não a hiperplasia folicular e/ou oncocítica, 03 adenomas foliculares, 03 tireoidites sem neoplasia associada sendo 02 tireoidites de Hashimoto e 01 tireoidite de padrão esclerosante. Setenta e cinco nódulos eram malignos (72 carcinomas papilíferos, 01 carcinoma folicular, 01 carcinoma medular e 01 carcinoma anaplásico). Dentre os carcinomas papilíferos, 22 eram carcinomas papilíferos clássicos (Figura 10), 12 carcinomas papilíferos variante folicular e 38 microcarcinomas papilíferos. Dentre os pacientes com diagnóstico de malignidade (n=71), observou-se presença de extensão extratireoideana em 09 (12,7%) e invasão vascular angiolinfática em 07 (9,8%). A avaliação de metástases nodais foi realizada em 13 casos que possuíam esvaziamentos cervicais sendo 38,6% destes N1a (pN).

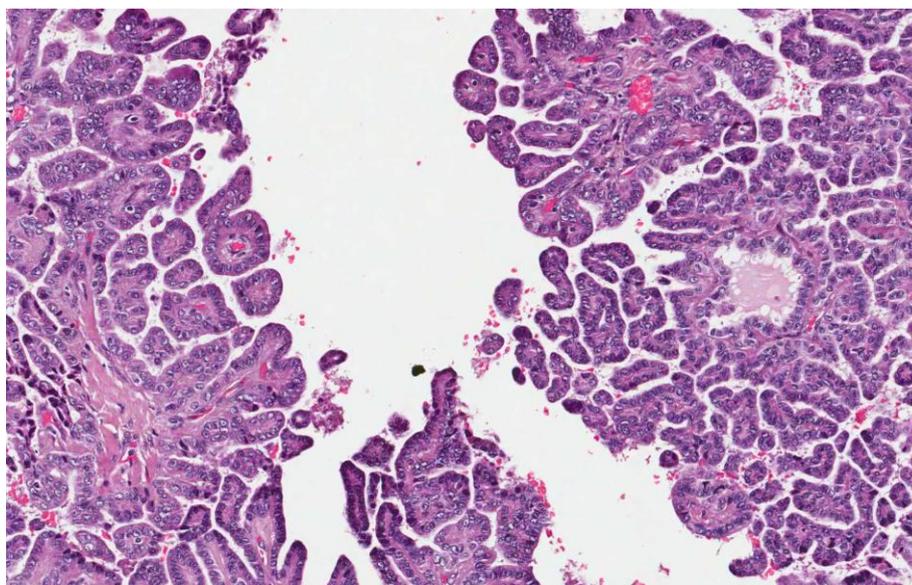


**Figura 8** - Frequência das classes de diagnóstico histológico

Estabelecendo-se uma correlação entre os diagnósticos citológicos e histológicos, pode-se observar que 23 dos 75 casos (30,7%) de PAAF com resultado indeterminado possuíam resultados histológicos benignos.



**Figura 9** - Exemplo de um corte histológico (espécime cirúrgico) com diagnóstico de Bócio coloide. À direita observa-se a lesão (nódulo) e à esquerda o parênquima tireoideano normal adjacente. Caso nº 131, aumento 2x.



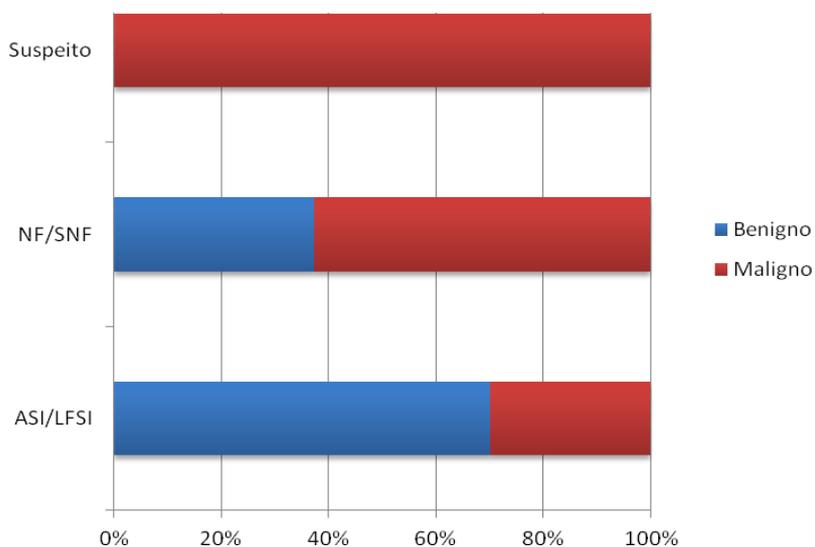
**Figura 10** – Carcinoma papilífero clássico (espécime cirúrgico). Caso nº 105, aumento 10x.

**Tabela 8** - Correlação entre as classes de diagnósticos citológicos e histológicos

		Diagnóstico Histológico				
		Benigno (outros)	Tiroidite	Adenoma	Carcinoma	Total
Diagnóstico Citológico	Benigno (II)	08	01	00	00	09
	ASI/LFSI (III)	05	02	00	03	10
	NF/SNF (IV)	13	00	03	27	43
	Susp. Mal.(V)	00	00	00	22	22
	Maligno (VI)	00	00	00	23	23
	<b>Total</b>	26	03	03	75	107

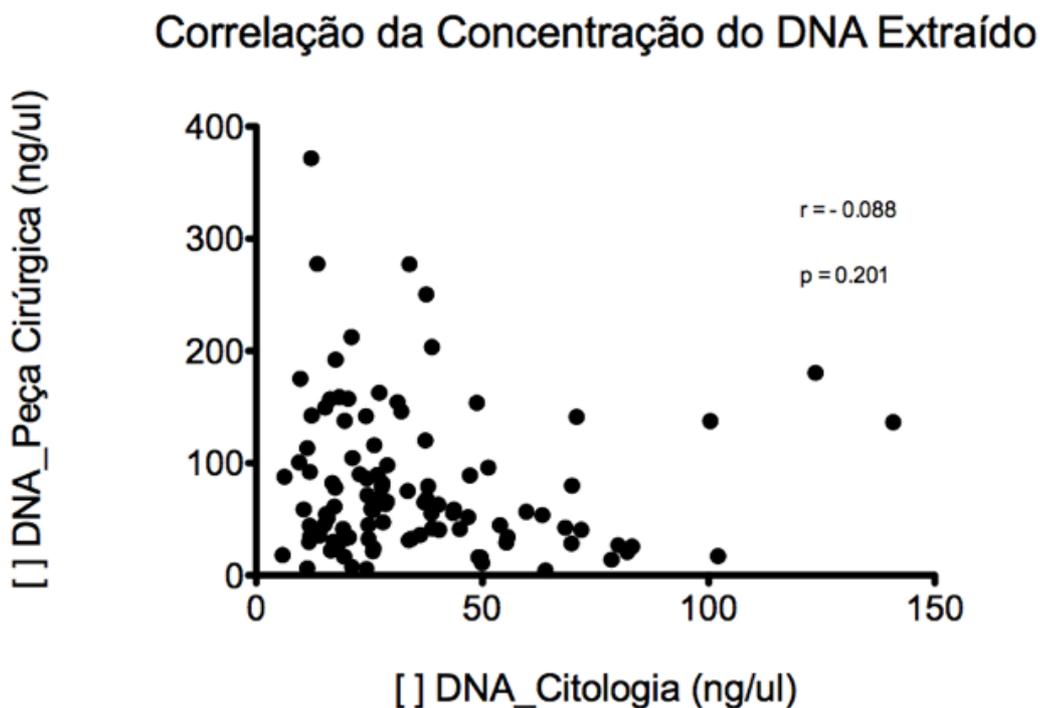
\*ASI/LFSI: Atipia de significado indeterminado/Lesão folicular de significado indeterminado ,  
NF/SNF: Neoplasia folicular/Suspeito para neoplasia folicular

Dentre as classes de Bethesda, a ASI/LFSI (III) foi a que apresentou maior probabilidade de benignidade - 7 casos em 10 (Tabela 8). Todos os casos da classe Suspeito para Malignidade (V) confirmaram-se malignos na histologia. E dentre os NF/SNF (IV), 37,2% eram benignos (Figura 11).



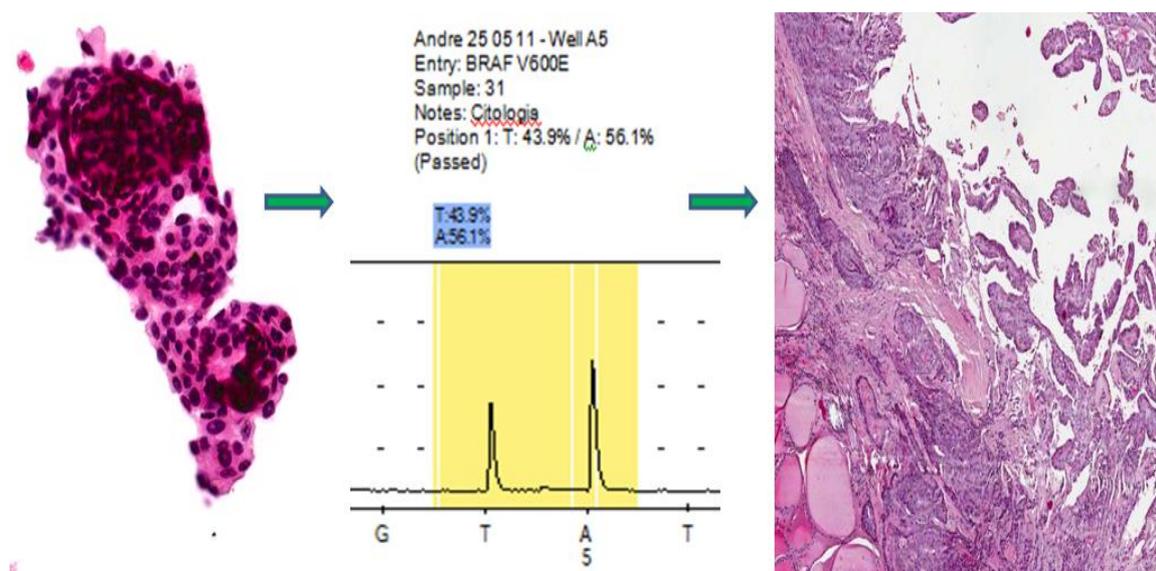
**Figura 11** - Distribuição das classes de diagnóstico citológico (Bethesda) em relação a malignidade confirmada na histologia.

A quantidade média de DNA extraído dos espécimes citológicos foi de 34,98 ng/μl variando entre 5,84 ng/μl e 140,79 ng/μl. Nos espécimes cirúrgicos emblocados em parafina a média foi de 80,29 ng/μl variando entre 4,19 ng/μl e 371,78 ng/μl. O coeficiente de correlação linear ( $r_{xy}$ ) entre a quantidade de DNA extraído dos espécimes citológicos *versus* a quantidade de DNA extraído dos espécimes emblocados em parafina foi de  $r = -0,088$  (Figura 12). A qualidade dos ácidos nucleicos extraídos, avaliada pelo Nanodrop e por meio de amplificação por PCR, foi considerada satisfatória em todas as amostras.



**Figura 12** - Correlação da concentração da quantidade de DNA extraído dos espécimes citológicos e dos espécimes cirúrgicos emblocados em parafina.

Em ambos os espécimes foi realizada através do método de pirosequenciamento (Figura 13) a avaliação para mutação dos seguintes genes: *BRAF* (códon 600), *HRAS* (códon 12, 13 e 61), *NRAS* (códon 12, 13 e 61), *KRAS* (códon 12 e 13) e *PIK3CA* (éxons 9 e 20). Dentre todos os genes, o *BRAF* foi o que apresentou maior incidência de mutação (47 casos mutados em um total de 107 casos testados em ambos os espécimes). A segunda mutação mais incidente foi a do gene *HRAS* - códon 61 (13 casos). A incidência de mutação nos demais genes foi baixa (*KRAS*) ou não detectada como no *NRAS* (códon 12 e 13), *HRAS* (códon 12) e *PIK3CA* (Tabela 9).



**Figura 13** – Figura esquemática demonstrando os três procedimentos realizados em cada caso. À esquerda o espécime citológico, no centro o pirosequenciamento e à direita o corte histológico do espécime cirúrgico emblocado em parafina. Caso nº 31 com citologia “Suspeito para malignidade (V)”, pirosequenciamento demonstrando presença de mutação em *BRAF* e na histologia um Carcinoma papilífero clássico.

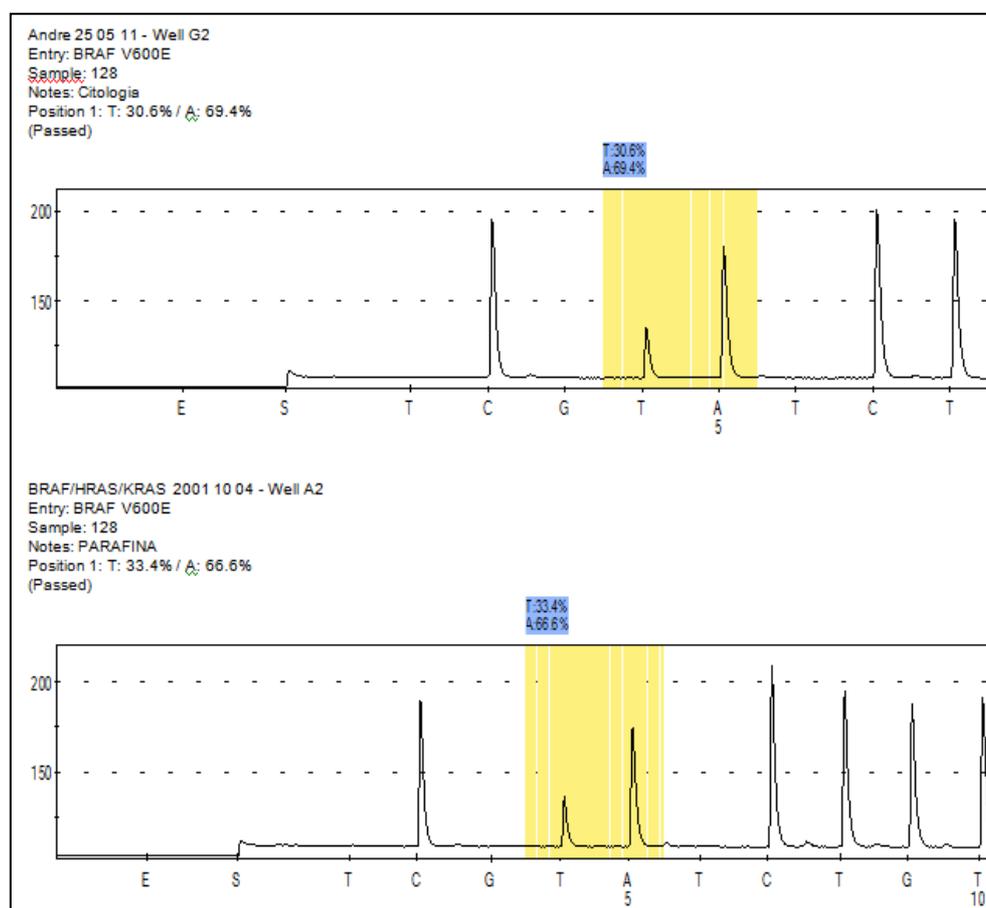
**Tabela 9** - Distribuição das mutações encontradas nos genes *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* correlacionadas aos diagnósticos citológicos e histopatológicos (n=20).

Gene	Códon/ Exon	Testes conclusivos Cito/Peça	Nº de casos mutados	Identificação	PAAF	Diagnóstico Histológico	Mutação	
<b>HRAS</b>	Códon 12	107/89	0	-	-	-	-	
	Códon 13	107/89	1	149	NF/SNF	CPVF	GGT>CGT	
	Códon 61	105/91	13	19	35	Maligno	Ca anapl.	CAG>CAC
				51	61	Maligno	CPVF	CAG>CAC
				61	70 dir.	NF/SNF	AF	CAG>CAC
				70 dir.	80	Suspeito	CP	CAG>CAC
				80	80	NF/SNF	mCP	CAG>CAC
				94	80	ASI/LFSI	BC	CAG>CAC
				94	94	NF/SNF	BC + HF	CAG>CAC
				102	102	NF/SNF	BC	CAG>CAC
				107	107	Maligno	CP	CAG>CAC
				108	108	Maligno	mCP	CAG>CAC
				111	111	Benigno	TLC Escler.	CAG>CAC
				115	115	NF/SNF	BC	CAG>CAC
148	148	NF/SNF	CP	CAG>CAC				
<b>NRAS</b>	Códon 12	106/105	0	-	-	-	-	
	Códon 13	106/105	0	-	-	-	-	
	Códon 61	106/102	1	146	NF/SNF	mCPVF	CAA>CGA	
<b>KRAS</b>	Códon 12	100/86	2	22	NF/SNF	mCPVF	GGT>AGT	
	Códon 13	100/86	3	101	Suspeito	mCPVF	GGT>AGT	
				40 <	Maligno	mCP	GGC>GAC	
				42	Suspeito	mCP	GGC>GAC	
			136 dir.	ASI/LFSI	mCP	GGC>GAC		
<b>PIK3CA</b>	Éxon 9	107/107	0	-	-	-	-	
	Éxon 20	106/107	0	-	-	-	-	

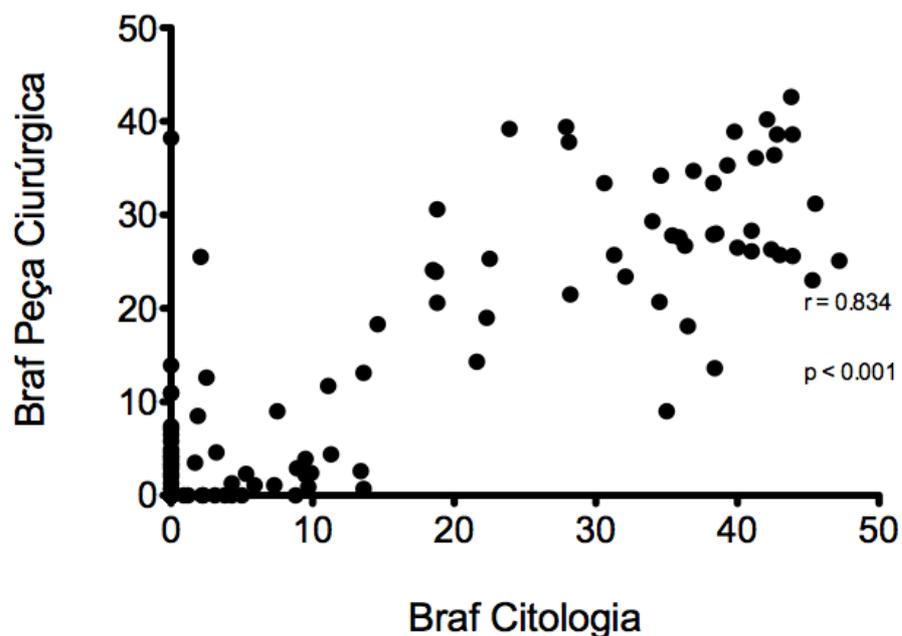
\* ASI/LFSI: Atipia de significado indeterminado/Lesão folicular de significado indeterminado, NF/SNF: Neoplasia folicular/Suspeito para neoplasia folicular, CPVF: Carcinoma papilífero variante folicular, AF: Adenoma Folicular, CP: Carcinoma papilífero, mCP: Microcarcinoma papilífero, mCPVF: Microcarcinoma papilífero variante folicular, BC: Bócio coloide, HF: Hiperplasia folicular, TLC: Tireoidite linfocítica crônica

A correlação entre a presença da mutação do gene *BRAF* nos espécimes citológicos e cirúrgicos pode ser avaliada em todos os casos (214 espécimes) e mostrou-se estatisticamente significativa com  $r$ : 0,834 (Figura 15). Dos 107 casos avaliados para *BRAF*, 101 mostraram-se concordantes em relação ao *status* mutacional por espécime (Figura 14). Dos 6 casos discordantes, 3 (casos 07, 61 e 107) apresentaram valores limítrofes ao *cut*

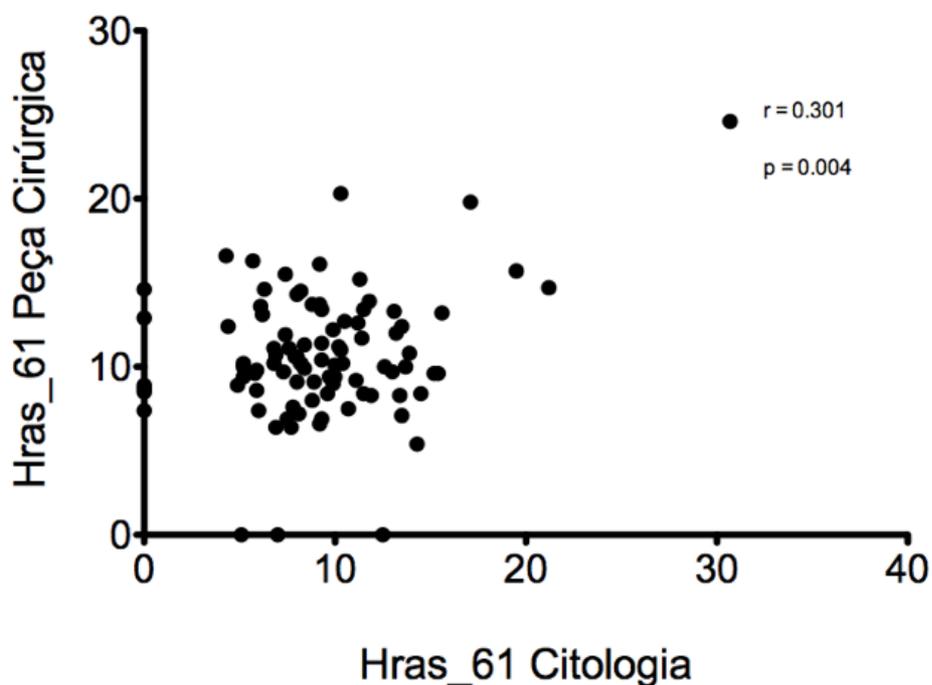
off (15%) variando 13,6 e 14,6%. Dois casos (22 e 30) apresentaram a mutação somente no espécime cirúrgico e somente um caso (14) apresentou a mutação no espécime citológico sendo selvagem no espécime cirúrgico. Neste caso o nódulo mediu 0,4 cm e a quantidade de DNA extraído foi baixa (6,36 ng/ul). Para o segundo gene com mutação mais incidente (*HRAS* códon 61) a correlação entre os espécimes para a presença da mutação pode ser feita em 91 casos e foi estatisticamente significativa com  $r: 0,301$  (Figura 16).



**Figura 14** - Pirogramas demonstrando presença da mutação em *BRAF* tanto no espécime citológico (gráfico superior) quanto no espécime cirúrgico (gráfico inferior). Caso nº 128.



**Figura 15** - Correlação entre a presença da mutação do gene *BRAF* por análise quantitativa (%) entre os espécimes citológicos e espécimes cirúrgicos emblocados em parafina.



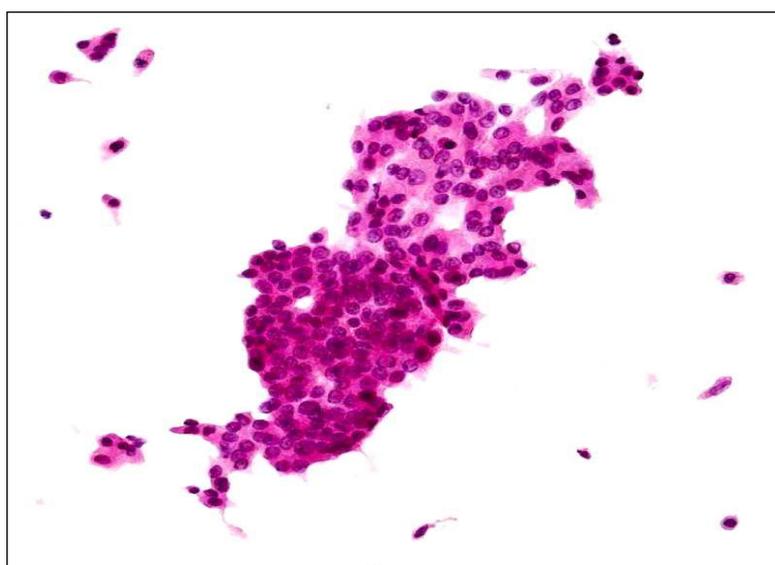
**Figura 16** - Correlação entre a presença da mutação do gene *HRAS* códon 61 por análise quantitativa (%) entre os espécimes citológicos e espécimes cirúrgicos emblocados em parafina.

Esta correlação foi concordante em 81 casos (89%). Dos 10 casos discordantes, 07 (19, 51, 61, 80, 111, 115 e 148) apresentaram valores limítrofes variando entre 13,2 e 15,6% e os outros 03 casos (35, 94 e 102) mostraram-se mutados somente no espécime cirúrgico. Não houve discordâncias nos testes conclusivos dos outros genes avaliados.

A mutação do gene *BRAF* foi detectada em 26 (34,6%) dos casos com diagnóstico citológico indeterminado e em (18) 78,2% dos casos com diagnóstico citológico positivo. Não houve mutação em *BRAF* dentre os casos benignos (n=9) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Correlação do status do *BRAF* no espécime citológico com o diagnóstico citológico

PAAF	<i>BRAF</i> Mutado	<i>BRAF</i> Selvagem
<b>Benigno (n= 9)</b>	00	09
<b>Indeterminado (n= 75)</b>	26	49
<b>Maligno (n= 23)</b>	18	05



**Figura 17** - Exemplo de citologia classificada como suspeito para malignidade (V). Caso nº 101. Aumento 20x.

Dentre os casos indeterminados (n=75), 43 eram do da classe NF/SNF (IV), 22 da classe Suspeito para Malignidade (V) (Figura 17) e 10 da classe ASI/LFSI (III). A mutação em *BRAF* foi identificada em 26 casos: 1 caso – classe III (ASI/LFSI), 9 casos – classe IV (NF/SNF), 16 casos – classe V (Suspeito para malignidade) (Figura 18). Em todos eles o diagnóstico histológico foi maligno. Nenhum dos nódulos confirmados como benigno apresentou a mutação. A sensibilidade da mutação do *BRAF* nos nódulos indeterminados foi de 50%, a especificidade de 100%, o VPP de 100% e o VPN de 60%.

Analisando especificamente a classe ASI/LFSI (III) notamos um VPN de 78%, VPP de 100%, sensibilidade de 33% e especificidade de 100%. Houve 2 casos malignos à histologia que foram *BRAF* selvagem (01 Carcinoma papilífero clássico T: 1,1 cm e 01 Microcarcinoma papilífero clássico T: 0,4 cm). Dentre eles, o Microcarcinoma papilífero (caso 136) apresentou mutação no códon 13 do gene *KRAS*. Na classe NF/SNF (IV) notamos um VPN de 47%, VPP de 100%, sensibilidade de 33% e especificidade de 100%. Dezoito casos eram malignos (01 Carcinoma papilífero clássico T: 1,1 cm, 06 Carcinomas papilíferos variante folicular T: 1,2 a 3 cm, 01 Microcarcinoma papilífero clássico T:0,8 cm, 08 Microcarcinomas papilíferos variante folicular T: 0,3 a 0,9, 01 Carcinoma folicular T: 1,1 cm e 01 Carcinoma medular T: 0,4 cm). Dentre eles foram identificadas 04 mutações nos outros genes: *HRAS* códon 61 (caso 148), *NRAS* códon 61 (caso 146), *HRAS* códon 13 (caso 149) e *KRAS* códon 12 (caso 22). Na classe Suspeito para malignidade (V), a sensibilidade é de

73% e o VPP é de 100%, no entanto a ausência de casos benignos neste grupo impossibilita o cálculo estatístico para VPN e especificidade. Seis casos eram malignos (02 Carcinomas papilíferos clássicos T: ambos medindo 1,5 cm, 01 Carcinoma papilífero variante folicular T: 2,1 cm, 02 Microcarcinomas papilíferos clássicos T: 0,5 a 1 cm e 01 Microcarcinoma papilífero variante folicular T: 0,6 cm). Dentre eles não houve nenhuma mutação detectada nos outros genes.

A correlação entre o status do gene *BRAF* com variáveis clínicas e histopatológicas (Tabelas 11 e 12) foi significativa quando relacionadas à variante histológica dos Carcinomas papilíferos e à presença de Tireoidite. A mutação foi detectada em 35 dos 43 Carcinomas papilíferos clássicos ( $p: 0,001$ ) e em 38 dos 52 casos sem tireoidite ( $p: 0,024$ ). Dentre os 09 casos que apresentaram extensão extratireoideana, 07 eram mutados (percentagem de alelo mutado: mediana 42,50 e média 39,83 comparado a mediana 35,50 e média 33,52 nos casos sem extensão extratireoideana com  $p 0,098$ ). Metástase linfonodal foi avaliada em 13 casos. Dentre os 08 mutados, 06 eram positivos para metástase (percentagem de alelo mutado: mediana 42,00 e média 40,14 comparado a mediana 34,00 e média 32,67 nos casos sem metástase linfonodal com  $p 0,062$ ).

Os microcarcinomas papilíferos exibiram aspectos morfológicos e mutacionais similares aos carcinomas papilíferos. Dos 21 casos clássicos, 17 (80,9%) mostravam a mutação comparado a 10/17 (58,8%) na variante folicular. Os dois casos de microcarcinoma papilífero com invasão

extratireoidiana e invasão vascular foram *BRAF* mutados, assim como 1/3 dos casos de metástase linfonodal.

Em relação ao gênero e idade, observa-se que dentre os 16 homens portadores de nódulos malignos confirmados à histologia, 12 (75%) eram *BRAF* mutado e que dos 37 pacientes de até 45 anos 26 (70,2%) apresentavam a mutação.

Dos 34 pacientes que relataram não possuir histórico familiar para câncer, 24 (70,6%) apresentavam a mutação. E dos 07 pacientes que relataram ter tido outro tipo de câncer, 05 (71,4%) eram *BRAF* selvagem.

Em sete casos observamos dupla mutação, sendo 04 casos com *BRAF* e *HRAS* códon 61, 01 caso *BRAF* e *KRAS* códon 12 e 02 casos *BRAF* e *KRAS* códon 13.

**Tabela 11** - Correlação das variáveis clinico-patológicas com o status do gene *BRAF* avaliado entre os casos confirmados como maligno no espécime cirúrgico (n=75 nódulos, 71 pacientes – 13 com esvaziamento cervical)

	<i>BRAF</i> Mutado	<i>BRAF</i> Selvagem	p
<b>Tamanho do Tumor (n=75)</b>			
até 1,0 cm	27	12	0,242
>1,0cm	20	16	
<b>Variantes do CP (n= 75)</b>			
CP Clássico	35	08	<b>0,001</b>
CP Var. Folicular	12	17	
<b>Ext. extra-tiroidiana (n= 71)</b>			
Sim	07	02	0,478
Não	39	23	
<b>Invasão vascular (n=71)</b>			
Sim	04	03	0,691
Não	42	22	
<b>Metástase Linfonodal (n=13)</b>			
Sim	06	03	1,000
Não	02	02	
<b>Tireoidite (n=71)</b>			
Sim	08	11	<b>0,024</b>
Não	38	14	

\* Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher para valores < 05.

Analisando-se a PAAF isoladamente como teste para diagnóstico definitivo de malignidade dentro desta casuística observou-se que sua sensibilidade foi de 30,67%. A análise molecular para *BRAF* considerando o teste positivo na presença da mutação mostrou sensibilidade de 58,67% (Tabela 13). Ao se associar a PAAF (citologia positiva) com o teste molecular (presença da mutação), a sensibilidade subiu de 30,67 para 65,33%.

**Tabela 12** - Correlação das variáveis clínicas com o status do gene *BRAF* entre os casos confirmados como maligno no espécime cirúrgico (n=71)

	<i>BRAF</i> Mutado	<i>BRAF</i> Selvagem	p*
<b>Gênero</b>			
<b>Fem.</b>	34	21	0,387
<b>Masc.</b>	12	04	
<b>Idade</b>			
<b>até 45 anos</b>	26	11	0,333
<b>&gt; 45 anos</b>	20	14	
<b>Rxt prévia (n=65)</b>			
<b>Sim</b>	00	02	0,144
<b>Não</b>	40	23	
<b>Não informado</b>	06	00	
<b>Histórico Familiar Ca (n=65)</b>			
<b>Sim</b>	16	15	0,134
<b>Não</b>	24	10	
<b>Não informado</b>	06	00	
<b>Outro Ca</b>			
<b>Sim</b>	02	05	0,088
<b>Não</b>	44	20	

\* Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher para valores < 05.

**Tabela 13** - Análise da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para PAAF isoladamente, para a detecção da mutação no gene *BRAF* como teste molecular e para a associação dos dois testes.

	TESTE		
	PAAF (%)	<i>BRAF</i> (%)	PAAF + <i>BRAF</i> (%)
<b>Sensibilidade</b>	30,67	58,67	65,33
<b>Especificidade</b>	100	100	100
<b>VPP</b>	100	100	100
<b>VPN</b>	38,10	50,79	55,17

Ambos os testes possuíram especificidade e valor preditivo positivo de 100%. O valor preditivo negativo foi maior (55,17%) na associação dos dois testes.

A contribuição dos outros genes (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA*) para o aumento da sensibilidade do teste não foi significativa devido à baixa incidência de mutação e pela diminuição da especificidade do teste devido à presença de mutação em nódulos benignos (Tabela 9).

## 7 DISCUSSÃO

Realizamos um estudo prospectivo unicêntrico com pareamento de amostras coletadas em um curto período de tempo cujos resultados indicam que a utilização de material remanescente do processamento da PAAF em meio líquido é confiável e tecnicamente reproduzível para análise mutacional através do método de pirosequenciamento e útil na identificação dos pacientes portadores de câncer em nódulos tireoidianos.

A amostra populacional se caracterizou pelo predomínio do sexo feminino que corresponde à maior incidência de doenças nodulares da tireoide neste gênero. A maioria dos pacientes possuía idade abaixo de 45 anos com nódulos que predominantemente mediram até 1cm sendo a maioria dos malignos estadiamento pT1apN0. Estes dados refletem a alta incidência de detecção de nódulos tireoidianos incidentais não palpáveis através do uso da ultrassonografia em larga escala realizada entre os exames de rotina.

A maioria dos pacientes não relatou histórico familiar para câncer e dentre os relatos houve um predomínio de outros tipos de câncer diferente de tireoide. A maioria relatou não possuir antecedente de neoplasia indicando que nesta amostra não houve evidência de tendência familiar ou de possíveis eventos de transmissão hereditária.

A exposição à radiação prévia foi um evento raro e por isso, nesta amostra, não foi possível estabelecer uma correlação significativa com a incidência do câncer de tireoide.

A detecção do hipotireoidismo como alteração do perfil funcional da tireoide mais comum correlaciona-se diretamente com a presença da Tireoidite de Hashimoto em 34% dos pacientes.

Devido ao fato de se tratar de um estudo com amostras pareadas (citologia X espécimes cirúrgicos), a grande maioria dos casos indicados para a cirurgia possuía diagnósticos citológicos prévios malignos ou indeterminados já que poucos são os casos de citologia benigna que são encaminhados ao procedimento cirúrgico. Desta forma, somado ao fato de se tratar de uma categoria diagnóstica de interesse para a pesquisa, houve neste estudo uma prevalência de amostras com resultados citológicos indeterminados. Devido a este enriquecimento da casuística com casos indeterminados, as frequências de malignidade e subtipos histológicos não refletem as frequências reais do serviço.

A análise histopatológica dos espécimes cirúrgicos revelou que 70% dos nódulos eram malignos e que dentre estes a grande maioria eram carcinomas papilíferos. Estes resultados são compatíveis com os dados epidemiológicos que relatam que o Carcinoma papilífero é o tipo mais freqüente de carcinoma da tireoide, correspondendo a cerca de 80% dos casos (ROSAI et al. 1994; DELELLIS et al. 2004, SIPOS e MAZZAFERRI 2010).

Através da correlação cito-histológica observou-se que 30,7% dos casos classificados como indeterminados na citologia mostraram-se benignos na peça cirúrgica. Este dado indica que a PAAF, isoladamente, é um procedimento com limitações que podem contribuir para condutas cirúrgicas em pacientes portadores de nódulos benignos. Dentre as classes de diagnóstico indeterminado, a ASI/LFSI (III) foi a que mostrou menor risco de câncer (7 nódulos benignos em 10 classificados nesta categoria). Baseado neste baixo risco de malignidade, alguns autores sugerem que uma conduta conservadora com acompanhamento ultrassonográfico e repetição da PAAF poderia ser mais apropriada para estes pacientes (NIKIFOROV et al. 2011).

Dos casos NF/SNF (IV) 37,2% eram benignos. Nestes casos a atual recomendação da ATA é a lobectomia diagnóstica com consideração de tireoidectomia total quando outros fatores apropriados estiverem presentes (ATA 2009).

Dentre os classificados como Suspeito para Malignidade, todos se mostraram malignos à histologia. Portanto, baseado nos resultados deste estudo, os pacientes classificados nesta categoria poderiam ser indicados à Tireoidectomia total como terapia inicial devido a alta probabilidade de malignidade.

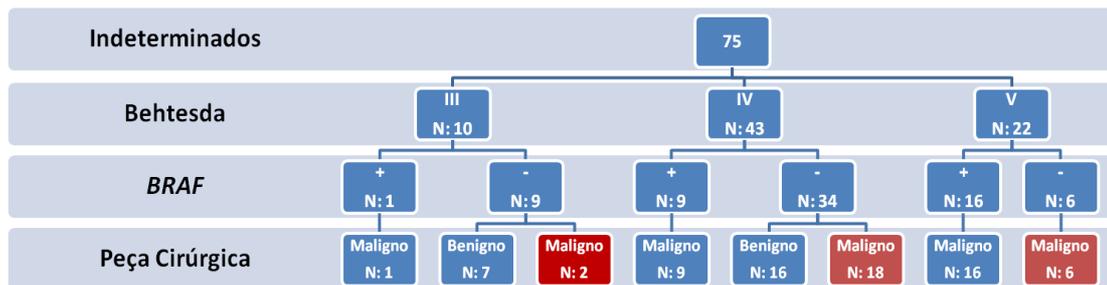
Dentre todos os genes analisados o que apresentou maior frequência de mutação foi o *BRAF*, sem qualquer falso positivo. Dentre os *RAS* analisados, *HRAS* códon 61 foi o mais incidente. Observaram-se 06 nódulos benignos portadores da mutação o que diminuiu a especificidade deste

marcador. Houve 01 mutação encontrada no *NRAS* códon 61 em um Microcarcinoma papilífero variante folicular, 01 mutação no códon 13 do *HRAS* em um Carcinoma papilífero variante folicular e 05 mutações em *KRAS* sendo todas em nódulos malignos. Estes dados indicam que dentre o painel de genes analisados neste estudo, o incidente mais frequente, altamente específico e com contribuição na identificação de nódulos tireoidianos malignos foi a mutação em *BRAF*. Além disso, a análise do status mutacional entre os espécimes (citologia x peça cirúrgica) pareados demonstrou que a detecção da mutação no espécime citológico é altamente confiável e que se correlaciona significativamente com presença da mutação no mesmo nódulo ao espécime cirúrgico. Os poucos casos discordantes foram limítrofes em relação ao ponto de corte o que na verdade pode ser discutido e reavaliado caso a caso dentro de um contexto clínico e de imagem para definição de malignidade destes nódulos. Os casos em que a mutação foi detectada somente na peça cirúrgica podem ser explicados pelo fato da PAAF obter uma amostragem limitada em tumor que pode ser geneticamente heterogêneo (GUERRA et al. 2012) ou pelo fato de que utiliza-se para a análise molecular somente uma porção do espécime obtido por PAAF, por vezes pouco celular. Uma alternativa para tentar diminuir este tipo de discordância seria realizar uma aspiração exclusivamente dedicada ao teste molecular. Neste estudo, somente 4 casos foram excluídos por baixa quantidade de DNA indicando que a utilização de material remanescente da PAAF é viável. Talvez, em casos selecionados para repunção por material inadequado, esta prática possa ser contributiva.

Houve somente um caso (nº 14) em que a mutação foi detectada no espécime citológico e não na peça cirúrgica que foi atribuído ao fato de que neste caso o nódulo era pequeno (0,4 cm) e a quantidade de DNA extraído foi baixa (6,36 ng/ul) que pode ter interferido na amostragem tumoral e consequentemente no *status* mutacional do nódulo.

A utilização da análise da mutação de *BRAF* como teste molecular adjuvante contribuiu para a determinação de malignidade em 50% dos casos que previamente haviam sido classificados como indeterminados através da PAAF e que se mostraram malignos na histologia. Além disso, nenhum dos nódulos benignos apresentou a mutação. Estes dados indicam, portanto, que esta mutação tem alta especificidade e capacidade de identificar uma significativa proporção dos pacientes portadores de nódulos malignos.

Na classe Suspeito para malignidade (V) 73% dos casos mostraram-se mutados e poderiam ser classificados como malignos através dos resultados moleculares. Da mesma forma na classe NF/SNF (IV) 20,9% dos casos se definiriam como malignos e justificariam uma Tireoidectomia total como abordagem cirúrgica inicial diferentemente dos casos desta categoria em que a ATA recomenda lobectomia diagnóstica (Figura 18).



**Figura 18** - Distribuição da presença da mutação do gene *BRAF* dentre as classes de diagnóstico citológico Bethesda correlacionada ao diagnóstico histopatológico dos espécimes cirúrgicos correspondentes (III = ASI/LFSI, IV = NF/SNF, V = Suspeito para malignidade).

O aumento da sensibilidade do teste de 30,67 para 65,33% ao se utilizar PAAF + *BRAF* é bastante expressivo e justifica sua utilização como ferramenta adjuvante de rotina em diagnósticos citológicos indeterminados.

Considerando ainda todo o painel de genes analisados, observamos 05 casos que apesar de terem sido *BRAF* selvagem mostraram-se mutados em *RAS* o que aumentaria para 31 casos em 52 (59,6%) que apresentaram alterações moleculares à PAAF e confirmaram-se malignos à histologia. O que diminuiu, porém, a especificidade de *RAS* como marcador preditor de malignidade foi sua detecção em nódulos benignos também relatada em outros estudos (NIKIFOROV et al. 2009; CANTARA et al. 2010). Sabe-se que *RAS* é um oncogene potente e existem evidências indiretas que sugerem que ele poderia promover uma transformação maligna com subsequente dediferenciação de células da tireoide (BURNS et al. 1992; BASOLO et al. 2000; FAGIN 2002; GARCIA-ROSTAN et al. 2003; ZHU et al. 2003). No entanto, o conceito de que adenomas foliculares são lesões pré-malignas que podem evoluir para carcinomas foliculares ainda permanece

indefinido. Portanto, no caso específico de lesões *RAS*-positivas para mutação, levanta-se a possibilidade de se discutir o risco de câncer e considerar uma lobectomia diagnóstica. Em outras situações, os achados do lobo oposto, de exames de imagem e dados clínicos poderiam em conjunto determinar um risco de câncer suficientemente elevado e a presença desta mutação poderia auxiliar na determinação de conduta justificando uma tireoidectomia total como recomendação de primeira linha apropriada. A pesquisa para mutações no gene *PIK3CA* resultou negativa em todas as amostras deste estudo indicando a baixa eficiência na utilização deste marcador como preditor de risco de malignidade em uma amostra predominantemente composta por carcinomas bem diferenciados e nódulos benignos da tireoide. Esta alteração genética é detectada mais frequentemente em Carcinomas foliculares e anaplásicos da tireoide (LIU et al. 2008) e mostrou-se negativa nos poucos casos com estas características pertencentes a este estudo.

Além do painel estudado, outras alterações genéticas têm sido relatadas na carcinogênese dos tumores tireoidianos e avaliadas como potenciais marcadores tumorais. A translocação *RET / PTC* envolve a translocação do domínio quinase do gene *RET* localizado no cromossomo 10q11.2 ao promotor de pelo menos 15 diferentes genes localizados no cromossomo 10 ou em várias outros cromossomos, resultando em uma ativação aberrante da via de MAPK ligante-dependente (NIKIFOROV e NIKIFOROVA 2011). Os rearranjos mais comuns são o *RET/PTC1* (q11.2; q21.2) e o *RET/PTC3* (q11.2; q11) (GRIECO et al. 1990; SANTORO et al. 1994). A distribuição do

rearranjo *RET / PTC* é heterogênea. Rearranjos clonais ocorrendo em > 1% das células tumorais são exclusivamente identificado em 10% a 20% dos Carcinomas papilíferos da tireoide (SANTORO et al. 1992). Estas mutações são comumente encontradas em indivíduos mais jovens, estão associadas a radiação ionizante e foi relatada em lesões benignas (ELISEI et al. 2001). A translocação *PAX8/PPAR $\gamma$*  é identificada lesões de padrão folicular e envolve uma fusão de *PAX8* (fator de transcrição da tireoide) com o gene *PPAR $\gamma$ 1* (peroxissomo proliferador-ativado receptor- $\gamma$  1), t (2; 3) (q13; p25) resultando em uma super-expressão de uma proteína de fusão (KROLL et al. 2000). O mecanismo da oncogênese ainda não está claro. Este rearranjo é identificado em 20% a 70% dos Carcinomas foliculares da tireoide, 0% a 20% de adenomas foliculares e de 0% a 5% de Carcinomas papilíferos. Os tumores com este rearranjo estão associados com um padrão de crescimento microfolicular, sólido ou trabecular e ainda não foi relatado em bócio ou carcinoma pouco diferenciado / anaplásico (MARQUES et al. 2002; NIKIFOROVA et al. 2002, 2003; FRENCH et al. 2003; CASTRO et al. 2006). Este estudo não avaliou estas alterações por alguns motivos: são menos frequentes em relação a *BRAF* e *RAS*, pelo fato de serem translocações/rearranjos seriam melhor avaliadas por métodos diferentes do pirosequenciamento, limitação na quantidade de DNA disponível além do fato de serem mais frequentes em Carcinomas foliculares que são incomuns nesta amostra.

Apesar do baixo número de casos com extensão extratireoidiana e metástase linfonodal presentes neste estudo observamos que há uma

tendência de correlação positiva entre a presença da mutação em *BRAF* e fatores determinantes de pior prognóstico. No entanto, seria necessária a realização de um estudo complementar com aumento no número de casos com estas características para que estas associações possam ser confirmadas, visto que o desenho deste estudo não foi focado nesta correlação e desta forma a população estudada não apresentou número significativo de indivíduos com estes eventos. Outros estudos demonstram que a detecção pré-operatória de mutações podem fornecer informações úteis para prognóstico e aperfeiçoar a conduta do paciente. Isto pode ser particularmente verdadeiro para a mutação *BRAF* porque esses pacientes podem ser considerados como candidatos a tireoidectomia total, mesmo que a citologia não seja definitiva para malignidade. Isto eliminaria a necessidade de consulta intra-operatória (exame de congelação) e/ou de uma segunda cirurgia subsequente para complementação de tireoidectomia, reduzindo custos e morbidade adicional. Em muitos estudos, *BRAF* parece servir como um marcador independente de agressividade dos carcinomas papilíferos de tireoide com aumento na frequência de metástases linfonodais (XING 2007; ELISEI et al. 2008). Um estudo recente demonstrou que a mutação em *BRAF* é um fator preditivo independente de risco para metástase em linfonodos de compartimento central em pacientes com Carcinoma papilífero e que sua detecção poderia guiar a extensão do tratamento cirúrgico inicial (HOWELL et al. 2012).

Da mesma forma, não está estabelecido se o teste molecular de espécimes de PAAF diagnosticados como malignos deve ser realizado.

Tumores *BRAF* mutados tem se mostrado mais prevalentes em casos com recorrência cervical, levando a um maior número de reoperações em comparação com os tumores sem a mutação (YIP et al. 2009; O'NEILL et al. 2010). Assim, YIP et al. (2009) sugerem que o conhecimento do status mutacional de *BRAF* poderia otimizar a extensão da cirurgia e linfadenectomia.

Além disso, com base nos dados que sugerem que Carcinomas Papilíferos *BRAF* mutados são mais resistentes ao tratamento com iodo radioativo devido a uma capacidade reduzida para interceptar radioiodo (DURANTE et al. 2007; RICARTE-FILHO et al. 2009) uma dose maior de iodo radioativo com menor supressão do hormônio estimulador da tireoide e um acompanhamento mais rigoroso tem sido sugeridos como um tratamento pós-operatório inicial de tumores portadores da mutação em *BRAF*.

A utilização de inibidores de tirosinaquinase como terapia-alvo para câncer de tireoide está em desenvolvimento ativo (ESPINOSA et al. 2007) e a detecção de mutações no material de PAAF pode ser útil no futuro para guiar terapias alvo mutação específicas que podem ser iniciadas no pré-operatório ou nos pacientes que não são candidatos à cirurgia.

## 8 CONCLUSÃO

A frequência das mutações dos genes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA* em espécimes de punção aspirativa por agulha fina foi de 41,1%, 7,5%, 0,9%, 4,6% e 0% respectivamente.

Dentre os genes analisados, a detecção da mutação em *BRAF* mostrou melhorar a estratificação do risco de câncer dos nódulos tireoidianos com resultados citológicos indeterminados através de um aumento significativo da sensibilidade e do valor preditivo negativo do teste na associação da PAAF à análise molecular. A pesquisa da mutação pode oferecer auxílio na determinação do tipo de abordagem cirúrgica inicial, visto que pacientes portadores de nódulos cujos resultados citológicos são indeterminados e que possuem a mutação podem ser considerados fortes candidatos à tireoidectomia total. Por outro lado, os pacientes de resultados indeterminados não portadores da mutação possuem um risco reduzido de malignidade e nestes casos uma lobectomia poderia ser proposta como abordagem cirúrgica inicial.

Os demais genes (*RAS* e *PIK3CA*) mostraram-se pouco incidentes, inespecíficos e não significativamente contributivos para a melhora na estratificação de risco de malignidade de nódulos tireoidianos.

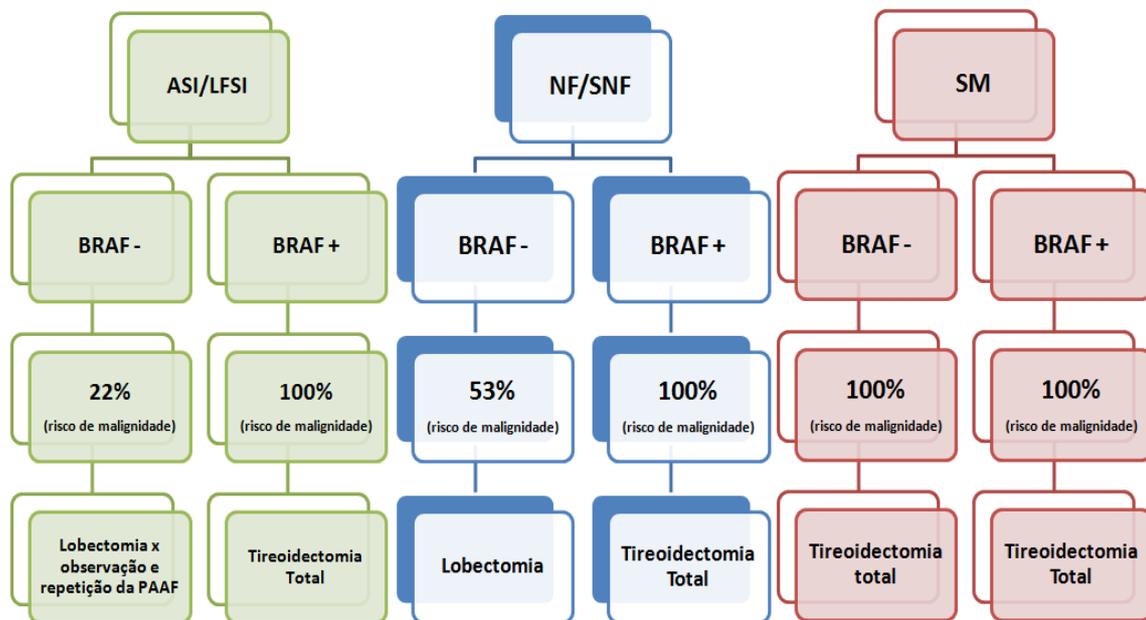
O pirossequenciamento mostrou ser um método prático, rápido e sensível para a detecção de mutações pontuais em espécimes citológicos remanescentes de PAAF de rotina conservados em meio líquido, inclusive

quando estes são paucicelulares, com ótima correlação com os espécimes cirúrgicos emblocados em parafina. Esta metodologia é reprodutível e poderá ser implementada pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo como protocolo para análise molecular de rotina em espécimes citológicos e/ou cirúrgicos de nódulos tireoidianos.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da pesquisa da mutação em *BRAF* no material obtido por punção aspirativa de nódulos tireoidianos foi de 58,67%, 100%, 100%, 50,79% respectivamente. A contribuição dos outros genes (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *PIK3CA*) para o aumento da sensibilidade do teste não foi significativa devido à baixa incidência de mutação e pela diminuição da especificidade do teste devido à presença de mutação em nódulos benignos.

A mutação em *BRAF* é mais frequente em Carcinomas papilíferos clássicos, em pacientes não portadores de Tireoidite (Tireoidite crônica linfocítica e/ou Tireoidite de Hashimoto) e demonstrou haver uma tendência de maior incidência em tumores mais agressivos com extensão extratireoidiana e metástase linfonodal.

Baseado nos achados moleculares, histopatológicos e citológicos deste estudo propõe-se o seguinte organograma (Figura 19) como protocolo de análise de alterações moleculares em punções aspirativas por agulha fina indeterminadas para auxílio no diagnóstico pré-operatório e proposta de conduta dos nódulos tireoidianos.



**Figura 19** - Organograma com riscos de malignidade de acordo com o “status” mutacional de *BRAF* vistos nas diferentes classes citológicas indeterminadas com proposta de tratamento inicial.

Apesar de não ter sido foco deste estudo, poderia ainda acrescentar-se a este organograma dados de estudos recentes que têm demonstrado que a mutação em *BRAF* é um fator preditivo independente de risco para metástase em linfonodos de compartimento central em pacientes com Carcinoma papilífero e que sua detecção poderia guiar a extensão do tratamento cirúrgico inicial com ressecção profilática de linfonodos deste compartimento (HOWELL et al. 2012), além de poder ainda contribuir na determinação da atividade de radioiodo utilizada para tratar estes pacientes (DURANTE et al. 2007; RICARTE-FILHO et al. 2009).

O organograma apresentado acima é mais uma ferramenta de auxílio à decisão terapêutica dos pacientes submetidos à PAAF de tireoide, devendo ser adaptado aos demais fatores clínicos e aspectos ultrassonográficos e até mesmo a vontade do paciente.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts e figures 2012**. Available from:

<URL:<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>> [2012 set 12]

[ATA] American Thyroid Association. Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. **Thyroid** 2009; 19:1167-214.

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:216-22.

Agah A, Aghajan M, Mashayekhi F, et al. A multi-enzyme model for pyrosequencing. **Nucleic Acids Res** 2004; 32:e166.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. **Clin Chim Acta** 2006; 363:83-94.

Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. **N Engl J Med** 2012; 367:705-15.

Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992–2006. **Thyroid** 2011; 21:125-34.

Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute thyroid fine-needle aspiration state of the science conference. **Diagn Cytopathol** 2008; 36:425-37.

Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. **Thyroid** 2000; 10:19-23.

Belfiore A, Giuffrida D, La Rosa GL, et al. High frequency of cancer in cold thyroid nodules occurring at young age. **Acta Endocrinol** 1989; 121:197-202.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. **Nucleic Acids Res** 2011; 39(Database issue):D32-7.

Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, et al. Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. **Ann Surg** 2007; 246:375-81; discussion 381-4.

Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res** 1989; 49:4682-9.

Brander A, Viikinkoski P, Nickels J, Kivisaari L. Thyroid gland: US screening in a random adult population. **Radiology** 1991; 181:683-7.

Broderick DK, Di Ch, Parrett TJ, et al. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas and medulloblastomas. **Cancer Res** 2004; 64:5048-50.

Bruneton JN, Balu-Maestro C, Marcy PY, Melia P, Mourou MY. Very high frequency (13 MHz) ultrasonographic examination of the normal neck: detection of normal lymph nodes and thyroid nodules. **J Ultrasound Med** 1994; 13:87-90.

Bruni P, Boccia A, Baldassarre G, et al. PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells is mediated by p27kip1. **Oncogene** 2000; 19:3146-55.

Burns JS, Blaydes JP, Wright PA, et al. Stepwise transformation of primary thyroid epithelial cells by a mutant Ha-ras oncogene: an in vitro model of tumor progression. **Mol Carcinog** 1992; 6:129-39.

Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:7678-81.

Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, et al. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. **J Clin Endocrinol Metab** 2010; 95:1365-9.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:4240-5.

Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al. PAX8-PPAR gamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:213-20.

Cibas ES, Ali SZ; NCI Thyroid FNA State of the Science Conference. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. **Am J Clin Pathol** 2009; 132:658-65.

Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, et al. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. **J Clin Endocrinol Metab** 2010; 95:1365-9.

Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, et al. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. **Cancer Res** 1997; 57:4710-3.

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

DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. **Pathology and genetics of tumours of endocrine organs**. Lyon: IARC Press; 2004. [WHO Classification of Tumours, v. 8; IARC WHO Classification of Tumours, n° 8]

Di Cristofaro J, Marcy M, Vasko V, et al. Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. **Hum Pathol** 2006; 37:824-30.

Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. **J Clin Endocrinol Metab** 2007; 92:2840-3.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. **AJCC: Thyroid. AJCC cancer staging manual**. 7<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 2010 p 87-96.

Elisei R, Romei C, Vorontsova T, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:3211-6.

Elisei R, Ugolini C, Viola D, et al. BRAF (V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a year median follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93:3943-9.

Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD. Targeting BRAF in thyroid cancer. **Br J Cancer** 2007; 96:16-20.

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

Finley DJ, Lubitz CC, Wei C, Zhu B, Fahey TJ 3rd. Advancing the molecular diagnosis of thyroid nodules: defining benign lesions by molecular profiling. **Thyroid** 2005; 15:562-8.

French CA, Alexander EK, Cibas ES, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. **Am J Pathol** 2003; 162:1053-60.

Frisk T, Foukakis T, Dwight T, et al. Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 35:74-80.

Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. **Oncogene** 2003; 22:6455-7.

Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, et al. Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:3226-35.

Gimm O, Perren A, Weng LP, et al. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue and benign and malignant epithelial thyroid tumors. **Am J Pathol** 2000; 156:1693-700.

Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. **Acta Cytol** 1987; 31:587-90.

Grant CS, Hay ID, Gough IR, McCarthy PM, Goellner JR. Long-term follow-up of patients with benign thyroid fine-needle aspiration cytologic diagnoses. **Surgery** 1989; 106:980-5; discussion 985-6.

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. **Cell** 1990; 60:557-63.

Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, Fugazzola L, Budillon A, Moccia T, Fenzi G, Vitale M. The primary occurrence of BRAF(V600E) is a rare clonal event in papillary thyroid carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2012; 97(2):517-24.

Halachmi N, Halachmi S, Evron E, et al. Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 1998; 23:239-43.

Hay ID, Thompson GB, Grant CS, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940–1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. **World J Surg** 2002; 26:879-85.

Hegedus L. Clinical practice: the thyroid nodule. **N Engl J Med** 2004; 351:1764-71.

Hou P, Liu D, Shan Y, et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:1161-70.

Howell GM, Nikiforova MN, Carty SE, et al. BRAF V600E mutation independently predicts central compartment lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer. **Ann Surg Oncol** 2012 Sep 1. [Epub ahead of print]

Hu S, Ewertz M, Tufano RP, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:98-104.

Jo YS, Huang S, Kim YJ, et al. Diagnostic value of pyrosequencing for the BRAF(V600E) mutation in ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy samples of thyroid incidentalomas. **Clin Endocrinol** 2009; 70:139-44.

Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. **Ann Surg** 2007; 246:466-70; discussion 470-61.

Kim SK, Kim DL, Han HS, et al. Pyrosequencing analysis for detection of a BRAFV600E mutation in an FNAB specimen of thyroid nodules. **Diagn Mol Pathol** 2008; 17:118-25.

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signalling pathway in papillary thyroid carcinoma. **Cancer Research** 2003;63:1454-7.

Knauf JA, Ma X, Smith EP, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. **Cancer Res** 2005; 65:4238-45.

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

Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. **Science** 2000; 289:1357-60.

Lazzereschi D, Mincione G, Coppa A, et al. Oncogenes and antioncogenes involved in human thyroid carcinogenesis. **J Exp Clin Cancer Res** 1997; 16:325-32.

Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast and hepatocellular carcinomas. **Oncogene** 2005; 24:1477-80.

Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2875-8.

Liu Z, Hou P, Ji M, et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93:3106-16.

Maciel RM, Kimura ET, Cerutti JM. Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular). **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2005; 49(5):691-700.

Manenti G, Pilotti S, Re FC, Della Porta G, Pierotti MA. Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. **Eur J Cancer** 1994; 30A:987-93.

Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3947-52.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of *ras* oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. **Mol Endocrinol** 1990; 4:1474-9.

[NCI] National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). 2012. Available from: <[http://www.seer.cancer.gov/csr/1975\\_2009\\_pops09/index.html](http://www.seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/index.html)> [2012 set 12]

Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. **Am J Surg Pathol** 2002; 26:1016-23.

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:2318-26.

Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. **J Clin Endocrinol Metab** 2009; 94:2092-8.

Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. **Nat Rev Endocrinol** 2011; 7:569-80.

Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, 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. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96:3390-7.

Nordstrom T, Alderborn A, Nyrén P. Method for one-step preparation of double-stranded DNA template applicable for use with Pyrosequencing technology. **J Biochem Biophys Methods** 2002; 52:71-82.

O'Neill CJ, Bullock M, Chou A, et al. BRAF(V600E) mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring preoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer. **Surgery** 2010; 148:1139-45; discussion 1145-6.

Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. **Biol Cell** 2001; 93:53-62.

Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, Prinz RA, Xu X. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. **Cancer** 2005; 103:2261-8.

Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. **Cancer Res** 2009; 69:4885-93.

Ringel MD, Hayre N, Saito J, et al. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. **Cancer Res** 2001; 61:6105-11.

Rosai J, Carcangiu ML, De Lellis RA. **Atlas of tumor pathology: tumors of the thyroid gland**. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 1992. [Third series, Fascicle 5, Atlas of tumor pathology].

Rubino C, de Vathaire F, Dottorini ME, et al. Second primary malignancies in thyroid cancer patients. **Br J Cancer** 2003; 89:1638-44.

Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. **Cancer Res** 2005; 65:2554-9.

Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, et al. The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1992; 75:714-20.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science** 2004; 304:554.

Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. **Arch Surg** 1998; 133:419-25.

Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. **J Clin Oncol** 2004; 22:2954-63.

Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, et al. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. **J Clin Invest** 1992; 89:1517-22.

Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, et al. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. **Oncogene** 1994; 9:509-16.

Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Differentiated thyroid cancer presenting initially with distant metastasis. **Am J Surg** 1997; 174:474-6.

Shaha AR. Thyroid cancer: extent of thyroidectomy. **Cancer Control** 2000; 7:240-5.

Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. **Clin Oncol** 2010; 22:395-404.

Stamataki M, Anninos D, Broutzos E, et al. The role of liquid-based cytology in the investigation of thyroid lesions. **Cytopathology** 2008; 19:11-8.

Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Oncogene profile of papillary thyroid carcinoma. **Surgery** 1999; 125:46-52.

Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simoes M. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. **Hum Pathol** 2006; 37:781-6.

Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:2745-52.

Vasko V, Saji M, Hardy E, et al. Akt activation and localisation correlate with tumor invasion and oncogene expression in thyroid cancer. **J Med Genet** 2004; 41:161-70.

Wang Y, Hou P, Yu H, et al. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2007; 92:2387-90.

Ward LS, Marrone M, Camargo RY, et al. Low-risk differentiated thyroid carcinoma-literature review and management guidelines. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2006; 50(3):550-7.

Weng LP, Gimm O, Kum JB, et al. Transient ectopic expression of PTEN in thyroid cancer cell lines induces cell cycle arrest and cell type-dependent cell death. **Hum Mol Genet** 2001; 10:251-8.

Werk EE Jr, Vernon BM, Gonzalez JJ, Ungaro PC, McCoy RC. Cancer in thyroid nodules. A community hospital survey. **Arch Intern Med** 1984; 144:474-6.

Wynford-Thomas D. Origin and progression of thyroid epithelial tumours: cellular and molecular mechanisms. **Horm Res** 1997; 47:145-57.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer** 2005; 12:245-62.

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

Yamamoto Y, Maeda T, Izumi K, Otsuka H. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A study of 408 autopsy cases. **Cancer** 1990; 65:1173-9.

Yang J, Schnadig V, Logorno R, Wasserman PG. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. **Cancer** 2007; 111:306-15.

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

Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. **Am J Clin Pathol** 2003; 120:71-7.

## Anexo 1 - Protocolo de análise de peça cirúrgica carcinoma da tireoide

RGH: ..... N° do laudo: .....

1. Macroscopia
  - a. Tamanho da Tireoide:
  - b. Peso:
  - c. Tamanho do Maior nódulo maligno:
  - d. Localização do Maior nódulo maligno:
  - e. Multicentricidade:
  
2. Microscopia:
  - a. Tipo Histológico:
  - b. Padrão arquitetural predominante (se papilífero)  
Papilar Folicular
  - c. Padrão celular predominante (se papilífero)  
Usual Céls Altas Céls Colunares Oxifílicas Escamóide Outro
  - d. Índice Mitótico (10 campos):
  - e. Desmoplasia:
  - f. Tireoidite associada: Intensidade:
  - g. Infiltração extra-tiroidiana Sim Não
  - h. Invasão vascular:
    1. Sanguínea
    2. Linfática
  - i. Metástases em Linfonodo:
    1. \_\_\_ LN acometidos/ \_\_\_ LN ressecados
    2. Níveis:
  
3. Metástases à distância
  - a. Sim Não
  - b. Local de metástase: Fígado Pulmão Ossos Outro
  - c. Se outro local, por favor, especifique  
\_\_\_\_\_
  
4. Estádiamiento: T\_\_\_\_N\_\_\_\_M\_\_\_\_
  
5. Outros dados:

## **Anexo 2 - Estadiamento patológico TNM - American Joint Committee on Cancer (AJCC)**

### **Primary Tumor (pT)**

pTX: Não pode ser avaliado

pT0: Sem evidências de tumor primário

pT1: Tumor menor ou igual a 2 cm , limitado a tireoide

pT1a: Tumor menor ou igual a 1 cm no maior eixo, limitado a tireoide

pT1b: Tumor maior do que 1 cm e menor do que 2 cm no maior eixo, limitado a tireoide

pT2: Tumor maior do que 2 cm e menor do que 4 cm, limitado a tireoide

pT3: Tumor maior do que 4 cm limitado a tireoide ou qualquer tumor com mínima extensão extratireoidiana (ex. extensão para músculo esternotireoideano ou partes moles peritireoideanas)

pT4a: Doença moderadamente avançada. Tumor de qualquer tamanho se estendendo além da cápsula tireoidiana com invasão de tecido subcutâneo, laringe, traqueia, esôfago e nervo laringo recorrente.

pT4b: Doença muito avançada. Tumor com invasão de fáscia pré-vertebral, comprometimento de artéria carótida ou vasos mediastinais

### **Todos os carcinomas anaplásicos são considerados tumores pT4.**

T4a: carcinoma anaplásico intratireoidiano, cirurgicamente ressecável

T4b: carcinoma anaplásico com extensão extratireoidiana, cirurgicamente irressecável

### **Linfonodos regionais (pN)**

pNX: Não pode ser avaliado

pN0: Ausência de metástase para linfonodos regionais

pN1a: Metástase nodal para nível VI (pretraqueal, paratraqueal e prelaringeol/Delfiano)

pN1b: Metástases cervicais unilaterais, bilaterais ou contralaterais para níveis I, II, III, IV, V ou para linfonodos retrofaríngeos e/ou mediastinais superiores (nível VII).

### **Metástase à distância (pM)**

pM0: Ausência de metástase à distância

pM1: Presença de metástase à distância

**Anexo 3 - Protocolo de Avaliação Clínica de pacientes portadores de Doença Nodular Tireoidiana**

Nome: ..... RGH: .....

Cidade/Estado:.....

Sexo:.....

Idade:.....

História de exposição à radiação ionizante:

- Terapia de radiação para doença maligna ou benigna durante a infância
- Terapia de radiação para doença maligna quando adulto
- Acidente Nuclear
- Outros: .....

História Familiar positiva para:

- Câncer de Tireoide
- Câncer de Paratireoide
- Síndrome de Neoplasia Endócrina Múltipla

Perfil de função tireoidiana:

- Eutireoideano
- Hipotireoidismo
- Hipertireoidismo

História de outros tipos de câncer:

- Não
- Sim, qual: .....

Outras informações:

## Anexo 4 - Protocolo de extração de DNA dos espécimes citológicos

- a. Transferência da amostra de tecido obtida por scrape das lâminas preparadas pelos métodos "Thinprep" para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo e identificado com o número do caso.
- b. Adição imediata de 110 µl de Buffer ATL em temperatura ambiente (15-25°C).
- c. Adição de 10 µl de Proteinase K e mistura por pulso vórtex durante 15 segundos.
- d. Colocação do tubo de 1,5 ml em um Thermomixer e incubação a 56°C durante toda noite (overnight) a 400 rpm até a amostra ficar completamente lisada.
- e. Adição de 100 µl de Buffer AL, fechamento da tampa e mistura por pulso vórtex durante 15 segundos. (Obs: Adição de 1 µl de RNA carrier já anteriormente dissolvido em Buffer AE antes da realização do vórtex).
- f. Adição de 100 µl de Etanol (96-100%), fechamento da tampa, mistura por pulso vórtex durante 15 segundos e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente (15 a 25 °C).
- g. Centrifugação rápida do tubo de 1,5 ml para remoção de gotas localizadas na parte interna da tampa.
- h. Transferência cautelosa de todo o lisado para a coluna de eluição (QIAamp MinElute Column), fechamento da tampa, centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto e colocação da coluna em um tubo de coleção de 2 ml limpo com descarte do tubo contendo fluido.
- i. Abertura cautelosa da coluna com adição de 500 µl de Buffer AW1. Fechamento da tampa e centrifugação a 8000 rpm (6000 xg) por 1 minuto. Colocação da coluna em um tubo de coleção de 2 ml limpo com descarte do tubo contendo resíduo de centrifugação.
- j. Abertura cautelosa da coluna com adição de 500 µl de Buffer AW2. Fechamento da tampa e centrifugação a 8000 (6000 xg) rpm por 1 minuto. Colocação da coluna em um tubo de coleção de 2 ml limpo com descarte do tubo contendo resíduo de centrifugação.
- k. Abertura cautelosa da coluna com adição de 500 µl de Álcool 80%. Fechamento da tampa e centrifugação a 8000 (6000 xg) rpm por 1 minuto. Colocação da coluna em um tubo de coleção de 2 ml limpo com descarte do tubo contendo resíduo de centrifugação.
- l. Centrifugação em velocidade máxima a 14000 rpm (20000 xg) por 3 minutos até secar a membrana completamente.
- m. Colocação da coluna em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo e descarte do tubo de coleção contendo o resíduo de centrifugação. Abertura cautelosa da tampa da coluna e aplicação de 40 µl de água destilada no centro da membrana.
- n. Fechamento da tampa e incubação em temperatura ambiente (15-25 °C) por 5 minutos.
- o. Centrifugação em velocidade máxima a 14000 rpm (20000 xg) por 1 minuto, retirada da coluna e quantificação no Nanodrop. Neste momento a coluna de eluição não foi desprezada para que nos casos em que a quantificação fosse insatisfatória houvesse possibilidade de reeluição.

## **Anexo 5 - Protocolo de extração de DNA dos espécimes cirúrgicos emblocados em parafina**

- a. Raspado (“scrape”) de cada lâmina na região tumoral anteriormente delineada em lâmina de HE correspondente.
- b. Colocação do material raspado diretamente em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo e identificado com o número do caso.
- c. Adição de 1 ml de Xilol Absoluto ao tubo, com posterior fechamento de sua tampa e mistura por pulso vórtex durante 10 segundos.
- d. Centrifugação em velocidade máxima 14000 rpm (20000 xg) por 2 minutos em temperatura ambiente (15 a 25 °C).
- e. Remoção do sobrenadante por pipetagem com conservação do pellet.
- f. Adição de 1ml de Álcool Absoluto ao pellet e mistura por pulso vórtex.
- g. Centrifugação em velocidade máxima 14000 rpm (20000 xg) por 2 minutos em temperatura ambiente.
- h. Remoção do sobrenadante por pipetagem com conservação do pellet.
- i. Abertura do tubo e incubação em temperatura ambiente (15 a 25 °C) até evaporação do etanol residual.
- j. Suspensão do pellet com 180 µl de Buffer ATL.
- k. Adição de 20 µl de Proteinase K e mistura por pulso vórtex.
- l. Incubação a 56 °C por 1 hora (até a lise completa da amostra).
- m. Incubação a 90 °C por 1 hora.
- n. Centrifugação do tubo para remoção das gotas na parte interna da tampa.
- o. Transferência cautelosa de todo o lisado para a coluna de eluição (QIAamp MinElute Column), fechamento da tampa, centrifugação a 8000 rpm (6000 xg) durante 1 minuto e colocação da coluna em um tubo de coleção de 2 ml limpo com descarte do tubo contendo resíduo de centrifugação.
- p. Abertura cautelosa da coluna com adição de 500 µl de Buffer AW1. Fechamento da tampa e centrifugação a 8000 rpm (6000 xg) por 1 minuto. Colocação da coluna em um tubo de coleção de 2 ml limpo com descarte do tubo contendo resíduo de centrifugação.
- q. Abertura cautelosa da coluna com adição de 500 µl de Buffer AW2. Fechamento da tampa e centrifugação a 8000 rpm (6000 xg) por 1 minuto. Colocação da coluna em um tubo coletor de 2 ml limpo com descarte do tubo contendo resíduo de centrifugação.
- r. Centrifugação em velocidade máxima 14000 rpm (20000 xg) por 3 minutos até secar a membrana.
- s. Colocação da coluna em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo e descarte do tubo de coleção contendo resíduo de centrifugação. Abertura cautelosa da tampa da coluna e aplicação de 45 µl de água destilada no centro da membrana.
- t. Fechamento da tampa e incubação em temperatura ambiente (15-25 °C) por 5 minutos. Centrifugação em velocidade máxima 14000 rpm (20000 xg) por 1 minuto, retirada da coluna e quantificação no Nanodrop. Neste momento a coluna de eluição não foi desprezada para que nos casos em que a quantificação fosse insatisfatória houvesse possibilidade de reeluição.