

ANÁLISE MOLECULAR DA MUTAÇÃO V600E DO GENE BRAF EM MICROCARCINOMA PAPILAR DE TI

Antonio Paulo Machado Gontijo, Vera Aparecida Saddi
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM GENÉTICA

Introdução

O câncer de tireoide é a neoplasia maligna endócrina mais comum, com incidência crescente em todo o mundo. Esse crescimento é quase que exclusivamente às custas do carcinoma papilar da tireóide (CPT) e, atualmente, 30-50% desses tumores são microcarcinomas papilares de tireóide (MCPT). Os diversos sistemas de estratificação para classificação desses pacientes em baixo e alto risco têm se revelado insatisfatórios, levando à procura de um marcador molecular que possa compor uma estratificação mais efetiva. A mutação V600E do gene BRAF constitui um evento genético frequente dos carcinomas papilares da tireóide, refletindo seu potencial como marcador tumoral nos MCPT. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência dessa mutação em 80 espécimes de MCPT, oriundas do Serviço de Patologia do Hospital Araújo Jorge de Goiânia, de pacientes operados entre 1999 a 2006.

Métodos, procedimentos e materiais

Este estudo foi avaliado e recomendado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge, conforme Parecer no. 049/2010 (Anexo 1). Somente após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, em 7 de dezembro de 2009, foram iniciadas as análises. Tratou-se de um estudo retrospectivo com utilização de dados clínicos obtidos de prontuários e análise de espécimes tumorais fixados em formol e incluídos em parafina. Assim, o estudo não ofereceu nenhum risco evidente aos pacientes incluídos na análise. Duzentos e quarenta e oito casos de MCPT foram inicialmente selecionados a partir dos livros de registro do Setor de Anatomia Patológica (SAP) do HAJ, no período de 1998 a 2006. Destes, 36 (14,5%) apresentavam metástases linfonodais. Oito casos foram excluídos por falta de informações no prontuário ou escassez de tecido tumoral. Foram selecionados então 28 casos de MCPT metastáticos. Dentre os MCPT não-metastáticos, 52 casos foram pareados com relação ao sexo e idade, totalizando um grupo com 80 pacientes. Os blocos contendo os fragmentos de tumores foram levantados a partir dos arquivos do SAP, montados em lâminas de vidro e corados pela hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica e comprovação do diagnóstico histopatológico. A revisão histopatológica foi feita por dois patologistas colaboradores deste estudo, Dra. Rita de Cássia Alencar e Dr. Élbio Cândido de Paula, ambos do SAP do HAJ, de acordo com a classificação de doenças malignas da tireóide da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004). Os pacientes incluídos no estudo apresentavam diagnóstico histopatológico comprovado de microcarcinoma papilífero de tireóide, blocos de parafina disponíveis no SAP do HAJ e dados clínicos e histopatológicos, incluindo: idade, gênero, tamanho do tumor, comprometimento metastático de linfonodos regionais, metástase à distância e extensão extra-tireoidiana. Os dados clinicopatológicos foram colhidos a partir dos respectivos prontuários e utilizados para a confecção de um banco de dados. A mutação V600E do gene BRAF foi analisada de acordo com o procedimento proposto por Cohen et al, 2003. Utilizou-se primers específicos para o exon 15 do gene BRAF e amplificação gênica, produzindo fragmentos amplificados com 224 pares de bases (pb). Tais fragmentos foram submetidos à digestão com utilização da endonuclease de restrição TspRI que reconhece a mutação T1799A no gene BRAF. A enzima de restrição TspRI digere o produto de PCR produzindo três bandas principais: uma com 125 pb, uma com 87pb e outra com 12pb, a partir do alelo do tipo selvagem. A mutação T1799A abole um sítio de restrição, resultando em uma banda de 212 pb a partir do alelo mutante e bandas residuais a partir do alelo selvagem. A extração de DNA das amostras de CPT foi feita com a utilização do kit comercial Wizard DNA Isolation Kit (Promega), utilizando o protocolo padronizado no Laboratório de Diversidade Genética da PUC-Goiás.

Resultados e discussão

Um banco de dados clínicos e histopatológicos dos pacientes com carcinomas papilíferos de tireóide foi elaborado, utilizando o Software Microsoft Excel® (Microsoft Corp, EUA). Análise estatística descritiva desses dados foi realizada e tabelas de contingência foram preparadas. Os aplicativos estatísticos Prism 5 e InStat 4 foram usados para as análises comparativas das variáveis qualitativas. O teste do Chi-quadrado com correção de Yates, nível de significância de 5% foi usado para as análises comparativas e o teste exato de Fisher, quando apropriado. Os oitenta casos analisados neste estudo foram operados no Hospital Araújo Jorge (HAJ) da Associação de Combate de Câncer em Goiás, por seis cirurgiões do Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ. Apenas sete pacientes foram tratados com tireoidectomia parcial. Quarenta e um casos tiveram a tireoidectomia totalizada depois de incidentalmente ter sido encontrado MCPT em casos diagnosticados previamente com doença benigna. Os dados clinicopatológicos dos pacientes incluídos neste estudo encontram-se descritos na tabela 3. Os MCPT tiveram ampla prevalência no sexo

feminino (91,25%) e foram mais comuns na quarta década de vida. Com relação ao tamanho, os tumores menores que 5mm foram os mais frequentes (42,5%). A multifocalidade ocorreu em 51 pacientes (63,75%) e o extravasamento glandular foi observado em 19 casos (23,75%). Vinte e oito (35%) pacientes apresentaram metástase linfonodal regional, enquanto apenas dois casos (2,5%) tinham invasão vascular. Atipia celular intensa foi vista em 11 casos (13,75%). Apenas um tumor de células altas e dois de células colunares foram identificados nesse grupo. O restante eram subtipos usuais e foliculares. Tireoidite de Hashimoto foi detectada em 15 pacientes (18,75%). Recidiva loco-regional ocorreu em 14 pacientes (17,5%), num período de seguimento de cinco anos, e tais pacientes foram tratados com esvaziamento cervical linfonodal radical e radioiodoterapia adjuvante.

Conclusão e referências

Nossos resultados permitem concluir que a mutação V600E do gene BRAF é uma alteração genética comum nos microcarcinomas papilíferos de tireóide, podendo representar um evento precoce na carcinogênese da glândula tireóide. Uma vez que, neste estudo, não foram observadas associações significativas entre a mutação V600E do gene BRAF e os aspectos clinicopatológicos dos microcarcinomas papilares de tireóide, as implicações clínicas desta mutação no prognóstico desses tumores não podem ser deduzidas. Uma vez que a mutação V600E do gene BRAF foi altamente prevalente nos microcarcinomas papilares de tireóide avaliados neste estudo, sua utilização na confirmação diagnóstica dos microcarcinomas de tireóide é relevante, especialmente nos casos com diagnóstico citológico inconclusivo. A presença da mutação V600E do gene BRAF nos microcarcinomas papilares de tireóide, não permite, entretanto, com base nos nossos resultados, mudar as condutas terapêuticas atuais. Como perspectiva, novas drogas dirigidas à proteína BRAF poderão ter papel terapêutico relevante em pacientes selecionados, num futuro próximo.

ALBAREL, F. B.; CONTE-DEVOLX, et al. (2012). "From nodule to differentiated thyroid carcinoma: Contributions of molecular analysis in 2012." *Ann Endocrinol (Paris)* 73(3): 155-64. ALBORES-SAAVEDRA, J. and J. Wu (2006). "The many faces and mimics of papillary thyroid carcinoma." *Endocr Pathol* 17(1): 1-18. BALOCH, Z. W. and V. A. LIVOLSI (2007). Our approach to follicular-patterned lesions of the thyroid. *J Clin Pathol* 60(3): 244-50. BALOCH, Z. W.; LIVOLSI, V. A. (2008). "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". BARRET, K. E.; BARMAN, S. M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. (2010). Gonorrhea's Review of Medical Physiology. BELGE, G. L.; ROQUE, et al. (1998). Cytogenetic investigations of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic findings and histology. *Cancer Genet Cytogenet* 101(1): 42-8. BONGIOVANNI, M. P. M.; SADOW, et al. (2009). Poorly differentiated thyroid carcinoma: a cytologic-histologic review. *Adv Anat Pathol* 16(5): 283-9. BRADLY, D.; REDDY, P. et al. (2009). Incidental papillary carcinoma in patients treated surgically for benign thyroid diseases. *Surgery* 146(6): 1099-104. BYRD, J. K.; YAWN, R. J. et al. (2012). Well differentiated thyroid carcinoma: current treatment. *Curr Treat Options Oncol* 13(1): 47-57. CERRATO, A.; DE FALCO, V. et al. (2009). Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets. *J Mol Endocrinol* 43(4): 143-55. CHIACCHIO, S.; LORENZONI, A. et al. (2008). Anaplastic thyroid cancer: prevalence, diagnosis and treatment. *Minerva Endocrinol* 33(4): 341-57. CLARK, O. H. (2010). Thyroid and Parathyroid in Current Diagnosis & Treatment: Surgery, Ed. McGraw-Hill Companies Inc. COELI, C.; Brito, A. et al. (2005). Incidência e Mortalidade por Câncer de Tireóide no Brasil. *Archivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 49(4). COOPER, D. S.; DOHERTY, G. M. et al. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 19(11): 1167-214. CURADO, M. and MARTINS, E. (2006). Incidência e Mortalidade dos Cânceres de Cabeça e Pescoço no Brasil. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço* 35(3): 136-41. CURADO, M., E. Martins, et al. (2006). Câncer em Goiânia: Incidências e Tendências 1988 a 2003. CD-Rom. DAVIES, H.; BIGNELL, G. R. et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892): 949-54. DAVIES, L.; OUELLETTE, M. et al. (2010). The increasing incidence of small thyroid cancers: where are the cases coming from? *Laryngoscope* 120(12): 2446-51. DE MATOS, P. S.; FERREIRA, A. P. et al. (2006). Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in Brazilian autopsy and surgical series. *Endocr Pathol* 17(2): 165-73. DEAN, D. S. and GHARIB, H. (2008). Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(6): 901-11. DELELLIS, R. e. al. (2004). WHO Classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of endocrine organs. DURANTE, C.; PUXEDDU, E. et al. (2007). BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2840-3. EYCHENE, A.; BARNIER, J. V., et al. (1992). Chromosomal assignment of two human B-raf (Rml) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rml and B-

raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene* 7(8): 1657-60. FERREIRA, C. G. R., J. C. (2004). *Oncologia Molecular*, Editora Ateneu. FLAHERTY, K. T.; Puzanov, I. et al. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(9): 809-19.

Palavras-chave: BRAF; mutação V600E; microcarcinoma papilar de tireóide

Fomento: Bolsa FAPEG

Contato: apbrasil7@hotmail.com