



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

José Pedro dos Reis Cabral Pinto Lopes

Mutação do gene *BRAF* na história natural do carcinoma papilar da tireóide:
implicações diagnósticas e prognósticas

Abril, 2010

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

José Pedro dos Reis Cabral Pinto Lopes

Mutação do gene *BRAF* na história natural do carcinoma papilar da tireóide:
implicações diagnósticas e prognósticas

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Anatomia Patológica

Trabalho efectuado sobre a Orientação de:

Prof. Doutora Elsa Fonseca

De acordo com as Normas de Publicação da:

Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo

Abril, 2010

FMUP

Nome: José Pedro dos Reis Cabral Pinto Lopes

Endereço electrónico: m04045@med.up.pt

Título da Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio:

*Mutação do gene BRAF na história natural do carcinoma papilar da tireóide:
Implicações diagnósticas e prognósticas*

Nome completo do Orientador:

Elsa Maria Pereira da Fonseca

Nome completo do Co-Orientador:

Ano de conclusão: 2010

Designação da área do projecto de opção:

Anatomia Patológica

É autorizada a reprodução integral desta ~~Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio~~ (*cortar o que não interessar*) apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 16/04/2010

Assinatura: _____

José Pedro dos Reis Cabral Pinto Lopes

Eu, José Pedro dos Reis Cabral Pinto Lopes, abaixo assinado, nº mecanográfico 040801045, aluno do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 15/09/2010

Assinatura: José Pedro dos Reis Cabral Pinto Lopes

AGRADECIMENTOS

À Professora Elsa Fonseca, orientadora desta monografia, agradeço o apoio concedido, a partilha do saber e as valiosas contribuições e sugestões para o trabalho.

Agradeço à Professora Ana Azevedo Oliveira, a colaboração e a crítica construtiva, prestadas na elaboração das tabelas de dados.

ÍNDICE REMISSIVO

LISTA DE ABREVIATURAS	3
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	5
RESUMO	6
<i>ABSTRACT</i>	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
Pesquisa bibliográfica	9
Critérios de elegibilidade para esta revisão	9
HISTOTIPOS DE CARCINOMA PAPILAR DA TIREÓIDE	10
PATOGÊNESE MOLECULAR DO CANCRO DA TIREÓIDE	11
Mutações <i>BRAF</i>	13
Rearranjos do <i>RET/PTC</i> e <i>NTRK1</i>	16
Mutações do gene <i>RAS</i>	17
Rearranjos do <i>PAX8-PPARγ</i>	18
ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NO CARCINOMA PAPILAR DA TIREÓIDE	19
APLICAÇÃO CLÍNICA DAS MUTAÇÕES <i>BRAF</i>	21
Relevância diagnóstica do <i>BRAF</i> mutado	21
Relevância prognóstica do <i>BRAF</i> mutado	22
BRAF COMO ALVO TERAPÊUTICO NO CPT	27
REFERÊNCIAS	29

LISTA DE ABREVIATURAS

17-AAG	17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
AFT	adenoma folicular da tireóide
AKAP9	A kinase (PKA) anchor protein (yotiao) 9
ATP	adenosine-5'-triphosphate
BAAF	biópsia aspirativa com agulha fina
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CPT	carcinoma papilar da tireóide
DNA	deoxyribonucleic acid
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
FCCPT	forma clássica do carcinoma papilar da tireóide
FDA	Food and Drug Administration
Flt-3	FMS-like tyrosine kinase 3
GDNF	glial cell-derived neurotrophic factor
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GTP	guanosine-5'-triphosphate
Hsp 90	heat shock protein 90
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	microcarcinoma papilar
MEK 1/2	MAPK/ERK kinase 1 and 2
MMP12	matrix metalloproteinase 12
mRNA	messenger ribonucleic acid

NGF	nerve growth factor
NIS	sodium-iodide symporter
NTRK1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor type 1
PAX8	paired box gene 8
PDGFR β	platelet-derived growth factor receptor beta
PET	positron emission tomography
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RAS	rat sarcoma viral oncogene
RET	rearranged during transfection
SNC	sistema nervoso central
VCACPT	variante de células altas do carcinoma papilar da tireóide
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR 2/3	vascular endothelial growth factor receptor 2 and 3
VFCPT	variante folicular do carcinoma papilar da tireóide

LISTA DE FIGURAS

1. Representação esquemática da via de sinalização MAPK 12
2. Associação de determinadas alterações genéticas com certos fenótipos de CPT 20

LISTA DE TABELAS

1. Prevalência da mutação $BRAF^{V600E}$ em alguns subtipos histológicos do CPT 15
2. Correlação da mutação $BRAF^{V600E}$ com características clínico-patológicas convencionais do CPT 25

RESUMO

O carcinoma papilar, é a mais prevalente neoplasia maligna da tireóide, representando 85-90% de todos os casos, tendo a sua incidência aumentado nos últimos anos. É relativamente indolente, porém, outras formas pouco diferenciadas ou anaplásicas, mais agressivas, associam-se habitualmente a prognóstico reservado.

Aproximadamente metade dos carcinomas papilares aloja a mutação pontual com transverso da timina pela adenina (T1799A) no gene *BRAF*, com substituição da valina pelo glutamato (V600E), na cínase da serina/treonina *BRAF*. Tal alteração resulta na activação constitutiva da via de sinalização das cínases de proteínas activadas por mitogénios (MAPK), essencial para a transmissão de sinais de proliferação, gerados por receptores da superfície celular e elementos de sinalização citoplasmáticos, para o núcleo. É uma mutação mutuamente exclusiva com outras alterações genéticas comuns, reforçando o seu papel oncogénico independente na proliferação celular, sobrevivência e desdiferenciação tumoral. O *BRAF*^{V600E} ocorre exclusivamente no carcinoma papilar e em carcinomas anaplásicos que dele derivam, pelo que funciona como marcador de diagnóstico específico para este cancro, quando identificado em exames citológicos / histológicos. Esta mutação, emergiu recentemente, como um marcador de prognóstico potencial do carcinoma papilar da tireóide, após vários estudos terem sugerido encontrar-se associado a características clínico-patológicas, que predizem frequentemente progressão e recidiva tumoral, como a idade avançada, invasão extra-tireoideia e metastização ganglionar. É portanto considerado um marcador de doença agressiva nestas neoplasias, associando-se a incremento da recidiva tumoral e inclusivamente a perda de avidéz pelo iodo radioactivo. Alguns estudos não confirmaram estes achados.

O tratamento *standard* é geralmente bem sucedido em obter remissão completa, porém ineficaz na maioria dos pacientes com doença invasiva, metastática ou sem avidéz pelo iodo-131. O esclarecimento e reconhecimento de vias da carcinogénese, como passo fundamental na progressão tumoral e, em particular, aquelas que envolvem o *BRAF*, conduziram à investigação de moléculas com potencial interesse terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE:

Carcinoma papilar da tireóide; *BRAF*; Mutação pontual; Marcador diagnóstico; Estratificação prognóstica; Terapêutica dirigida.

***BRAF* GENE MUTATION IN THE NATURAL HISTORY OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA: DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC IMPLICATIONS**

ABSTRACT

The papillary carcinoma is the most prevalent malignant neoplasm of the thyroid gland, representing 85-90% of all cases, and its incidence has been increasing in recent years. It is relatively indolent, however other types poorly differentiated or anaplastic, are more aggressive and usually associated with poor prognosis.

Approximately half of these papillary carcinomas harbor a thymine-to-adenine transversion (T1799A) point mutation, in the gene encoding the serine/threonine-kinase B-type Raf kinase (*BRAF*), with substitution of valine by glutamate (V600E). Mutated *BRAF*, generates a constitutive activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway, which plays a critical role in transmitting proliferative signals generated by cell surface receptors and cytoplasmic signaling elements, to the nucleus. *BRAF* mutation is mutually exclusive with other common genetic alterations, supporting its independent oncogenic role in cell proliferation, survival and tumor de-differentiation. The *BRAF*^{V600E} occurs exclusively in papillary thyroid carcinoma and papillary carcinoma-derived anaplastic cancer, rising as a specific diagnostic marker for this tumor when identified in cytological / histological exams. This mutation has recently emerged, as a potential prognostic marker for papillary thyroid carcinoma, after several studies have found this mutation to be associated with some clinicopathological characteristics, known to predict tumor recurrence and progression, including, for instance, old patient age, extrathyroidal invasion and lymph node metastasis. It is therefore considered a marker of aggressive disease in these tumors, associated with increased cancer recurrence and even loss of radioiodine avidity. Several studies weren't able to confirm these associations.

The standard treatment is usually successful, and most patients experience complete remission, nevertheless, is ineffective in the majority with invasive or metastatic disease or non-radioiodine sensitive tumors. Recent knowledge and recognition about some oncogenic pathways, as a fundamental step on tumoral progression, in particular those involving *BRAF*, led to the development of numerous molecules with potentially therapeutic properties.

KEYWORDS:

Papillary thyroid carcinoma; *BRAF*; Point Mutation; Diagnostic marker; Prognostic stratification; Targeted therapy.

INTRODUÇÃO

Os carcinomas da tireóide são as neoplasias endócrinas mais prevalentes, representando aproximadamente 1% de todos os novos casos de cancro diagnosticados anualmente.^{1,2}

Dados epidemiológicos recentes reflectem um aumento na incidência de quase 240% durante a última metade do século XX, por razões que permanecem pouco claras, mas que em parte reflectem um diagnóstico mais precoce, apresentando-se actualmente com 4 e 12 casos por cada 100000 homens e mulheres, respectivamente.³⁻⁵ Contudo, esse aumento não foi acompanhado por um incremento correspondente de mortes pela doença, a qual apresenta uma taxa de mortalidade global de apenas 0.5/100000.^{2,6}

A maioria dos casos ocorre em indivíduos adultos, mas alguns tipos, especialmente os carcinomas papilares, podem ocorrer na infância. Torna-se ainda possível constatar uma preponderância no género feminino, sobretudo na faixa etária de adultos jovens e de meia-idade, provavelmente tendo alguma relação com a expressão de receptores de estrogéneos, no epitélio tireoideu neoplásico. Por outro lado, os casos que ocorrem na infância e nas fases mais avançadas da vida apresentam uma distribuição equilibrada pelos dois géneros.⁷

As neoplasias da tireóide classificam-se, histologicamente, em tumores derivados das células foliculares (carcinoma papilar, folicular, pouco diferenciado e anaplásico) e das células C ou parafoliculares (carcinoma medular). Destes, o carcinoma papilar da tireóide é o mais frequente e corresponde a aproximadamente 85-90% de todos os casos de neoplasia maligna tireoideia.^{1,2,5,8-10}

O aumento do número de novos casos de cancro da tireóide é atribuível, praticamente na sua totalidade, ao diagnóstico aumentado de CPT, sobretudo relacionado com melhorias na detecção precoce de doença subclínica, como é o caso dos microcarcinomas papilares. Também contribui para este acréscimo, a maior acuidade diagnóstica de carcinoma papilar por parte do patologista, permitindo identificar casos com características morfológicas menos evidentes.^{5,6,9,11}

Os carcinomas da tireóide diferenciados são relativamente indolentes e com elevada taxa de cura, pois o tratamento cirúrgico *standard*, em conjunto com a terapia com iodo radioactivo, é altamente eficaz na maioria dos doentes e possibilita, no caso particular do CPT, que a sobrevida aos 10 anos exceda os 90-95%.^{2,10,12} Contudo, 5-20% dos pacientes apresentará recidivas loco-regionais, e até 10% poderá exibir metastização à distância.¹² As recidivas podem resultar de um tratamento inicial incompleto ou da presença de um componente neoplásico agressivo.¹³

Quando esta neoplasia se torna cirurgicamente inoperável e/ou perde a avidéz para o iodo radioactivo, o paciente enfrenta uma possibilidade de cura remota, não existindo actualmente um tratamento curativo aplicável.¹⁴

Torna-se desta forma importante apostar no diagnóstico pré-cirúrgico preciso, na estratificação de critérios de prognóstico pré- e pós-cirúrgicos mais eficazes, bem como na investigação e desenvolvimento de terapêuticas mais eficientes para carcinomas papilares invasivos ou metastáticos que são irressecáveis e/ou refractários a tratamento com iodo radioactivo.¹⁵

MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi levada a cabo recorrendo à base de dados *online* da PubMed/MEDLINE, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>], tendo sido empregues os seguintes descritores: “*BRAF* AND (thyroid cancer OR thyroid carcinoma)”. A pesquisa devolveu 384 artigos indexados, publicados entre 1 de Abril de 2003 e 31 de Março de 2010.

Utilizaram-se alguns livros de texto e acedeu-se a determinados conteúdos *online* referenciados oportunamente ao longo deste trabalho.

Crítérios de elegibilidade para esta revisão

Com o objectivo de compilar uma grande parte da informação publicada, procuraram-se estudos que examinassem particularmente as associações entre a mutação *BRAF* e subtipos histológicos ou características clínico-patológicas convencionais do carcinoma papilar da tireóide. Essa selecção foi realizada com base na análise do *abstract*.

Para esse efeito adoptaram-se os seguintes critérios de inclusão: (1) artigos publicados até 31 de Março de 2010, redigidos em língua inglesa, portuguesa ou espanhola; (2) todos os estudos com dados apropriados, referentes a carcinomas papilares da tireóide com *BRAF* mutado; (3) todos os artigos de autores/grupos de investigação, com várias publicações neste domínio, foram incluídos. Foram excluídos todos os seguintes: (1) sem acesso a texto integral; (2) sem dados originais (artigos de revisão, metanálises); (3) dados clínico-patológicos inapropriados ou omissos; (4) estudos de casos clínicos; (5) fora do âmbito temático desta revisão.

HISTOTIPOS DE CARCINOMA PAPILAR DA TIREÓIDE

Os carcinomas papilares são lesões únicas ou multifocais, podendo alguns ser bem circunscritos e até mesmo encapsulados, embora a maioria seja infiltrativa do parênquima adjacente, apresentando margens mal definidas. Por vezes são visíveis áreas de fibrose e calcificação, e podem existir áreas císticas.⁷

A existência de múltiplas variantes morfológicas de CPT demonstra a pouca relevância da arquitetura tumoral para o diagnóstico. Este deve fundamentar-se na morfologia nuclear, marcada por certas particularidades:

1. núcleos volumosos e alongados, com aglomeração e sobreposição;
2. cromatina finamente dispersa, que causa uma aparência óptica clara ou de vazio, habitualmente descrita como núcleo em vidro fosco (“*ground-glass*”) ou com aspecto em “olho de órfã Annie”;
3. invaginações do citoplasma, que podem dar a aparência de pseudo-inclusões ou fendas nucleares.¹⁶

A forma clássica do CPT, é caracterizada por papilas complexas que se ramificam e possuem uma haste fibrovascular revestida por uma ou várias camadas de células epiteliais; também podem ser identificadas estruturas de calcificação concêntrica no eixo das papilas, denominadas de corpos psamomatosos.^{7,16}

A variante folicular apresenta os núcleos característicos do carcinoma papilar, mas tem uma arquitetura quase totalmente folicular, sem papilas.^{7,16}

A variante de células altas é caracterizada pela presença de células altas, com citoplasma intensamente eosinofílico cobrindo as estruturas papilares; têm geralmente grandes dimensões e associam-se a ampla invasão vascular, com extensão extra-tireoideia e metástases cervicais e à distância, ocorrendo habitualmente em indivíduos mais velhos.^{7,16} A variante de células colunares é constituída igualmente por células altas, embora com citoplasma claro, fazendo lembrar o endométrio secretor. A sua agressividade biológica é semelhante à do carcinoma papilar de células altas.¹⁷

A variante oncócítica (variante de células de Hürthle) é formada por células caracterizadas por um citoplasma eosinofílico e granular abundante, causado por acumulação mitocondrial. Esta neoplasia pode apresentar uma morfologia com papilas clássicas ou, muito mais frequentemente, possuir folículos.¹⁶

A variante sólida é caracterizada pela existência de ninhos e trabéculas de células tumorais alongadas dentro do estroma fibrovascular, apresentando semelhanças com a variante folicular.¹⁶

O microcarcinoma papilar é uma variante de CPT muito comum, que é definido como um carcinoma papilar que mede 1 cm, ou menos, de dimensão máxima; pode apresentar uma morfologia arquitectural clássica, folicular ou oncocítica, podendo ser encapsulada ou infiltrativa. Os MCP podem ser múltiplos e, quando associados a carcinomas papilares clinicamente evidentes ou de grandes dimensões, estão frequentemente relacionados com disseminação tumoral. Contudo, acredita-se que esta lesão quando identificada acidentalmente, seja de significado clínico mínimo, tanto mais que é um achado frequente em autópsias.^{16,18}

A variante encapsulada apresenta-se bem delimitada e confinada à tireóide, sendo rara a disseminação vascular e/ou linfática. Pode ser facilmente confundida com um adenoma, e tem um prognóstico excelente.⁷

A variante esclerosante difusa é rara e ocorre em indivíduos mais jovens, apresentando-se como um bócio bilateral. Acompanha-se de fibrose extensa, difusa, em toda a glândula, geralmente associada a um infiltrado linfocítico proeminente podendo simular uma tireoidite de Hashimoto. Trata-se de uma forma agressiva de CPT, que apresenta propensão para invasão linfática com metastização ganglionar, sendo também comum a metastização pulmonar.⁷

PATOGÉNESE MOLECULAR NO CANCRO DA TIREÓIDE

Os anos mais recentes foram marcados pela expansão dramática na compreensão da base molecular da carcinogénese da tireóide.²

Tornou-se evidente que os tumores tireoideus, em particular os de tipo papilar, apresentam frequentemente alterações genéticas que contribuem para a activação da via de sinalização MAPK. Esta cascata intracelular crucial regula o crescimento celular, a diferenciação, a apoptose e a sobrevivência, e, quando aberrantemente activada, a tumorigénese.^{2,5,10,14}

A activação fisiológica desta via é despoletada em resposta a múltiplos sinais mitogénicos (factores de crescimento, hormonas e citocinas) que interagem com os receptores tirosina-cínase presentes na superfície celular, activando-os (Fig. 1).^{2,5,19}

Uma vez activado, o receptor, através de uma série de proteínas adaptadoras, leva à activação do RAS localizado na superfície membranar interna, através da substituição do GDP pelo GTP. O RAS activo, por sua vez, interage e activa a cínase da proteína RAF, recrutando-a para a membrana, onde é activada. A RAF cínase do tipo B (BRAF), a mais abundante e potente na família RAF, encontra-se assim capaz de fosforilar e activar a MEK, que por sua vez fosforila e activa a ERK (ou MAPK). Quando activada, a ERK fosforila proteínas citoplasmáticas e é translocada para dentro do núcleo, onde regula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celulares.^{2,10,14,20-22}

As alterações moleculares encontradas nos carcinomas papilares podem ocorrer a diferentes níveis, como resultado do envolvimento dos genes que codificam o receptor tirosina-cínase (RET e NTRK1), dos dois efectores intracelulares da via da MAPK (uma proteína RAS de ligação ao GTP e uma cínase de serina-treonina BRAF), ou das proteínas nucleares (PAX8-PPAR γ).^{2,10,14,20-22}

As mutações de qualquer um destes genes podem ser encontradas em mais de 70% dos carcinomas papilares e são mutuamente exclusivas, pois raramente coexistem na mesma neoplasia tireoideia, sugerindo que a activação desta via de sinalização é essencial para a iniciação tumoral, mas que a alteração de um único effector da mesma é suficiente para a transformação celular neoplásica.^{2,20-22}

As alterações moleculares mais frequentes são as descritas nos parágrafos seguintes.

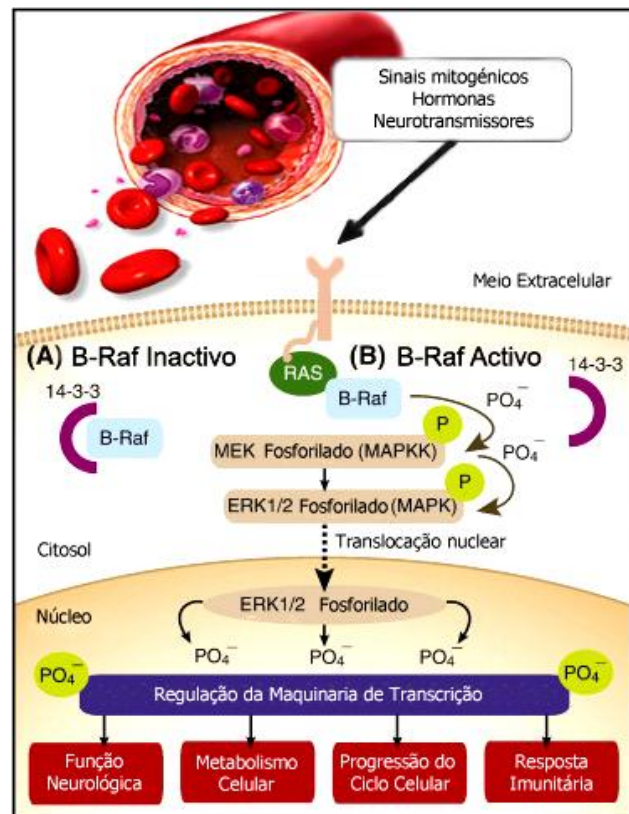


Figura 1. Representação esquemática da via de sinalização MAPK.

A sinalização começa no receptor TK, na membrana celular, após estimulação por sinais mitogénicos extracelulares (e.g. factores de crescimento). Quando activado após ligação ao GTP, a proteína RAS interage com a cínase da proteína RAF activando-a, depois de induzir uma alteração conformacional através da desfosforilação dos sítios de ligação do domínio regulador N-terminal, para a proteína 14-3-3 (co-factor para a actividade da RAF cínase), permitindo o seu recrutamento para a membrana plasmática. A BRAF (RAF cínase do tipo B) é a isoforma mais abundante e potente da família RAF nas células foliculares da tireóide. A BRAF activada fosforila e activa duas MEKs (MEK1 e MEK2) e estas, por seu turno, fosforilam e activam as duas ERKs subsequentes. As ERK1/2 (ou MAP cínases) fosforilam proteínas a jusante, muitas das quais são cínases, levando em última consequência a alterações na expressão de vários genes no núcleo, envolvidos na proliferação celular, sobrevivência e carcinogénese.

Adaptado de Nucera C. *et al*, 2009⁵.

Mutações *BRAF*

O gene *BRAF* e o produto proteico resultante são importantes para o controlo do ciclo celular, desempenhando um papel crucial na via de sinalização intracelular RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK, que culmina na activação da ciclina D1 e na proliferação celular.^{10,21,23,24}

A proteína *BRAF* pertence à família das cínases de serina-treonina RAF, tendo sido descritas 3 isoformas funcionais nas células de mamíferos: ARAF, *BRAF* e CRAF. Entre estes, o *BRAF*, cujo gene codificante está localizado no cromossoma 7q34, é o mais potente activador da via da MAPK.^{25,26} Expressa-se em níveis elevados em células neuronais, hematopoiéticas e no testículo, e é igualmente a isoforma predominante nas células foliculares da tireóide.^{2,4,27,28}

Estudos *in vitro*, com modelos de células tireoideias benignas, evidenciaram inicialmente um papel particularmente importante para o *BRAF*, como um regulador central da diferenciação e da capacidade proliferativa.^{2,29} Mais tarde, modelos *in vitro* e *in vivo*, vieram demonstrar que a sobreexpressão do *BRAF* activado induz transformação maligna e comportamento tumoral agressivo. Essas alterações estarão provavelmente relacionadas com expressão aumentada de metaloproteinase 12 da matriz (MMP12) e de VEGF.³⁰

As mutações activantes do *BRAF* foram já descritas em diversas neoplasias humanas, nomeadamente, e com maior expressão, no melanoma (63-66%), mas também no carcinoma seroso do ovário (33-40%) e ainda no carcinoma colo-rectal (11-20%).^{3,10,23}

Trata-se de uma mutação somática do tipo *missense*, que consiste na transversão da timina pela adenina (T1799A) no exão 15 do *BRAF*, que causa a substituição, na proteína, do aminoácido valina pelo glutamato (V600E), levando ao aparecimento da *BRAF*^{V600E}. Esta mutação produz a activação constitutiva da *BRAF* cínase, já que resulta da inserção de um resíduo carregado negativamente adjacente a um local de fosforilação (Ser599), o que causa a ruptura de interacções hidrofóbicas, entre resíduos exactamente no local de ligação do ATP que mantinha a conformação inactiva.^{2,5,23,24,31-34} Esta mutação, antes designada na literatura de V599E, foi corrigida em 1 codão em trabalhos mais actuais.³⁴⁻³⁶

Recentemente, outras mutações têm sido descritas no contexto do carcinoma papilar da tireóide: *BRAF*^{K601E}, *BRAF*^{VK600-1E}, *BRAF*^{V599ins}, *BRAF*^{V600E+K601del}, *BRAF*^{V600D+FGLAT601-605ins}, sendo todavia raramente encontradas no cancro da tireóide; demonstrou-se que todas estas mutações descritas desestabilizam a conformação inactiva do *BRAF* e induzem uma activação oncogénica constitutiva da enzima *BRAF* cínase.^{2,24,32,33,37-43}

Desde a descoberta inicial da mutação *BRAF* nos cancros humanos, houve mais de 100 mutações identificadas nesse gene, das quais se salienta a mutação *BRAF* pontual T1799A, que totaliza cerca de 90% de todas as mutações neste oncogene.^{10,27,44} A mutação *BRAF* afigura-se como uma alteração genética somática, não surgindo em contexto de carcinoma familiar da tireóide, no qual as mutações são germinativas.^{2,14}

A importância desta mutação é revelada pelos diversos estudos publicados neste âmbito e que têm demonstrado, nos últimos anos, que a mutação se encontra presente num grande número de casos de carcinoma papilar da tireóide (com prevalência média de 49%; Tab.1). Associa-se igualmente a elevada frequência na forma clássica e variante de células altas do CPT (com prevalência média de 54% e 68%, respectivamente; Tab.1), sugerindo que esta mutação funcione como um evento específico precoce para estes fenótipos de CPT, desempenhando um papel fundamental da iniciação da tumorigénese. Essa ideia é apoiada pela presença da mutação *BRAF* nos microcarcinomas papilares da tireóide (20-52%).^{2,43,45-48} Podemos encontrá-la, embora com menor expressão, em carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos da tireóide (com uma prevalência a variar entre os 20-30%), especialmente quando um componente de CPT bem diferenciado, contendo a mesma mutação, é detectado, fazendo pressupor que se trata de um evento que ocorre precocemente e que predispõe à desdiferenciação tumoral.^{36,48-50} É de salientar, portanto, a exclusividade anteriormente referida, chamando-se a atenção para o facto da mutação *BRAF* ocorrer com baixa expressividade na variante folicular do CPT (com prevalência média de 11%; Tab.1) e não ocorrer no carcinoma folicular ou noutras neoplasias tireoideias.²⁶

Em oposição aos carcinomas papilares dos adultos, os tumores pediátricos (esporádicos ou aqueles induzidos pela radiação), têm baixa prevalência de mutações *BRAF* (0-12%).^{34,51-53}

Importa acrescentar que, para além das mutações pontuais, o *BRAF* pode ser igualmente activado por rearranjo intra-cromossómico, nomeadamente através duma inversão paracêntrica do cromossoma 7q, com a consequente fusão entre os genes *AKAP9* e *BRAF*. A proteína de fusão daí resultante, apresenta uma elevada actividade cinásica.⁵⁴ Este rearranjo foi encontrado primariamente em tumores associados a história recente de exposição à radiação, nomeadamente em cerca de 11% dos CPT que se desenvolveram 5-6 anos após exposição a radiação ionizante.^{32,34}

Esta revisão sistemática está focada na mutação *BRAF* T1799A e, portanto, o termo *BRAF* mutado aplicar-se-á referindo-se, sempre, à mutação supramencionada.

Tabela 1. Prevalência da mutação *BRAF*^{V600E} em alguns subtipos histológicos do CPT

Estudo no.	Frequência (mutação/total (%))				Referência
	CPT total	FCCPT	VCACPT	VFCPT	
1	28/78 (36)	-	-	-	Kimura, 2003 ²¹
2	21/56 (38)	-	-	-	Xu, 2003 ⁵⁵
3	49/170 (29)	-	-	-	Namba, 2003 ⁴⁹
4	40/76 (53)	-	-	-	Fukushima, 2003 ⁵⁶
5	45/119 (38)	28/53 (53)	6/6 (100)	2/30 (7)	Nikiforova, 2003 ⁴⁸
6	45/124 (36)	28/53 (53)	1/3 (33)	0/32 (0)	Trovisco, 2004 ⁴³
7	36/95 (38)	28/42 (67)	-	6/51 (12)	Cohen, 2004 ⁵⁷
8	24/60 (40)	19/35 (54)	-	-	Puxeddu, 2004 ⁵⁸
9	8/16 (50)	-	-	-	Xing, 2004 ⁵⁹
10	30/82 (37)	-	-	-	Nikiforova, 2004 ⁵³
11	18/56 (32)	18/47 (38)	-	0/6 (0)	Fugazzola, 2004 ⁶⁰
12	19/60 (32)	-	11/14 (79)	-	Frattini, 2004 ²⁰
13	26/69 (38)	16/35 (45)	5/9 (55)	3/22 (14)	Salvatore, 2004 ⁶¹
14	58/70 (83)	-	-	-	Kim, 2004 ⁶²
15	37/72 (51)	-	-	-	Hayashida, 2004 ⁶³
16	7/15 (47)	-	-	-	Perren, 2004 ⁶⁴
17	4/12 (33)	-	-	-	Domingues, 2005 ⁶⁵
18	18/32 (58)	12/17 (71)	-	6/12 (50)	Powell, 2005 ⁶⁶
19	5/13 (38)	5/8 (62)	-	0/5(0)	Oler, 2005 ³⁹
20	38/61 (62)	36/52 (69)	-	2/9 (22)	Porra, 2005 ⁶⁷
21	55/176 (31)	33/72 (46)	-	4/54 (7)	Trovisco, 2005 ³⁷
22	-	50/65 (77)	-	-	Rosenbaum, 2005 ⁶⁸
23	68/79 (86)	-	-	-	Kim, 2005 ⁶⁹
24	-	21/33 (64)	-	-	Vasko, 2005 ⁷⁰
25	25/41 (61)	-	-	-	Giordano, 2005 ⁷¹
26	-	31/60 (52)	-	-	Kim, 2005 ⁴⁵
27	107/219 (49)	81/125 (65)	14/16 (88)	11/77 (14)	Xing, 2005 ⁷²
28	49/105 (47)	33/63 (52)	9/14 (64)	2/8 (25)	Liu, 2005 ⁷³
29	1/23 (4)	-	-	-	Collins, 2006 ⁷⁴ *
30	24/43 (56)	-	-	-	Carta, 2006 ⁴¹
31	19/43 (44)	14/31 (45)	-	5/12 (42)	Sapio, 2006 ⁷⁵
32	40/96 (42)	30/53 (57)	6/6 (100)	2/30 (7)	Adeniram, 2006 ⁷⁶
33	28/67 (42)	18/35 (51)	4/5 (80)	5/25 (20)	Riesco, 2006 ⁷⁷
34	58/100 (58)	51/82 (62)	-	3/6 (50)	Lee, 2006 ⁷⁸
35	-	15/20 (75)	-	1/12 (8)	Di Cristofaro, 2006 ⁷⁹
36	16/25 (64)	-	-	-	Matsukuma, 2006 ⁸⁰
37	102/161 (63)	-	-	-	Jo, 2006 ⁸¹
38	31/58 (54)	29/45 (64)	-	2/13 (15)	Jin, 2006 ⁸²
39	-	149/203 (73)	-	-	Kim, 2006 ⁸³
40	4/28 (14)	3/12 (25)	1/3 (33)	0/13 (0)	Sargent, 2006 ⁸⁴
41	52/61 (87)	25/30 (83)	4/4 (100)	1/3 (33)	Park, 2006 ⁸⁵
42	34/103 (33)	-	-	-	Kim, 2006 ⁸⁶
43	-	28/42 (67)	-	-	Zuo, 2007 ⁸⁷
44	24/40 (55)	-	-	-	Abrosimov, 2007 ⁸⁸
45	38/64 (59)	38/61 (62)	-	0/3 (0)	Takahashi, 2007 ⁸⁹
46	41/91 (45)	17/35 (49)	14/21 (67)	9/35 (26)	Ugolini, 2007 ⁴⁷
47	5/11 (45)	-	-	-	Erickson, 2007 ⁹⁰
48	56/93 (60)	48/66 (73)	-	7/18 (39)	Durante, 2007 ⁹¹
49	12/25 (48)	-	-	-	Brzezianska, 2007 ⁹²
50	31/50 (62)	10/18 (56)	12/15 (80)	9/17 (53)	Giannini, 2007 ⁹³
51	12/24 (50)	-	-	3/9 (33)	Hay, 2007 ⁹⁴
52	26/40 (65)	-	-	-	Nakayama, 2007 ⁹⁵
53	133/274 (49)	126/245 (51)	-	7/29 (24)	Kebebew, 2007 ⁹⁶
54	88/214 (41)	-	-	-	Rodolico, 2007 ⁹⁷
55	7/17 (41)	-	-	-	Rodrigues, 2007 ⁹⁸
56	11/16 (69)	8/11 (73)	2/3 (67)	1/2 (50)	Pizzolanti, 2007 ⁹⁹
57	214/500 (43)	56/82 (68)	32/40 (80)	21/112 (19)	Lupi, 2007 ¹⁰⁰
58	15/55 (27)	-	-	-	Goutas, 2008 ¹⁰¹
59	54/108 (50)	45/94 (48)	8/11 (73)	1/3 (33)	Wang, 2008 ¹⁰²
60	125/323 (39)	116/223 (52)	9/34 (26)	0/52 (0)	Frasca, 2008 ¹⁰³
61	27/49 (55)	13/16 (81)	-	6/17 (35)	Costa, 2008 ¹⁰⁴
62	11/58 (19)	-	-	-	Wang, 2008 ¹⁰⁵
63	40/83 (48)	38/74 (51)	0/1 (0)	1/3 (33)	Barzon, 2008 ¹⁰⁶
64	38/102 (37)	-	-	-	Elisei, 2008 ¹⁰⁷
65	17/35 (49)	15/26 (58)	-	1/7 (14)	Trovisco, 2008 ¹⁰⁸
66	30/40 (75)	-	-	-	Jo, 2009 ¹⁰⁹
67	42/54 (78)	41/52 (79)	0/1 (0)	1/1 (100)	Henderson, 2009 ¹¹⁰
68	88/101 (87)	-	-	-	Kim, 2009 ¹¹¹
69	24/64 (38)	-	2/4 (50)	-	Lee, 2009 ¹¹²
70	242/631 (38)	230/583 (39)	6/12 (50)	4/20 (20)	Ito, 2009 ¹¹³
71	58/120 (48)	48/73 (66)	-	10/47 (21)	Oler, 2009 ¹¹⁴
72	20/49 (41)	20/43 (47)	-	0/6 (0)	Baitei, 2009 ¹¹⁵
73	639/1032 (62)	-	-	-	Guan, 2009 ¹¹⁶
74	153/230 (67)	-	-	16/613 (3)	Park, 2009 ¹⁸
75	-	-	-	3/30 (10)	Santarpia, 2009 ¹¹⁷
76	5/14 (36)	-	-	-	Chuang, 2009 ¹¹⁸
77	48/74 (64)	(85)	-	(13)	Zatelli, 2009 ¹¹⁹
78	-	123/311 (40)	-	-	Pellegriti, 2009 ¹²⁰
79	99/199 (50)	22/33 (67)	30/36 (83)	7/58 (12)	Yip, 2009 ¹²¹
80	81/242 (33)	26/56 (46)	-	7/53 (13)	Sykorova, 2009 ¹²²
Total	3822/7863 (49)	1841/3415 (54)	176/258 (68)	169/1555 (11)	

* Único estudo com pacientes adultos com CPT, expostos a radiação na infância, não tendo sido contabilizado no total.

Rearranjos do *RET/PTC* e *NTRK1*

O gene *RET* está localizado no cromossoma 10q11.2 e contém 21 exões que ocupam mais de 60kb do DNA genómico.¹²³ Este gene codifica um receptor transmembranar com actividade de tirosina-cínase, que se expressa nos tecidos derivados da crista neural e nas células urogenitais durante a embriogénese.^{10,123} Este proto-oncogene envolve três domínios funcionais: um domínio extracelular que contém a região de associação com o ligando, um transmembranar hidrofóbico e um tirosina-cínase intracelular.^{8,124}

Os ligandos do receptor *RET* são factores de crescimento pertencentes à família do factor neurotrófico derivado das células da glia (GDNF). A associação receptor-ligando é mediada por co-receptores que não apresentam domínio intracelular e se encontram ancorados na membrana, induzindo dimerização do receptor com auto-fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio intracelular e subsequente activação da via de sinalização respectiva.^{123,124}

Na glândula tireóide, o *RET* é expresso em níveis elevados nas células C (parafoliculares), derivadas da crista neural, mas não nas células foliculares. Nestas pode ser activado de forma aberrante por rearranjo cromossómico, resultando na fusão da porção 3' do gene *RET* com a porção 5' de vários genes heterólogos, sendo esta translocação conhecida por *RET/PTC*.^{1,10,28} A característica comum aos genes que se fundem com o *RET* é a capacidade de se expressarem de forma ubíqua, o que permite o aparecimento da forma alterada do gene *RET* nas células foliculares, onde normalmente não se expressa.^{8,30}

As translocações patológicas envolvem frequentemente a fusão de um proto-oncogene com um outro gene que conduz a uma sobreexpressão ou activação constitutiva.^{30,54} Neste caso em particular, há fusão do domínio tirosina-cínase do proto-oncogene *RET* no cromossoma 10, com diferentes genes associados, nomeadamente o *H4* e o *ELE1*, que são os mais frequentemente envolvidos e ambos igualmente localizados no cromossoma 10.^{2,30,54} Estes rearranjos intra-cromossómicos paracêntricos que envolvem o gene *RET* e os genes *H4* ou *ELE1* levam ao aparecimento do *RET/PTC1* e *RET/PTC3*, respectivamente, reflectindo deste modo as alterações citogenéticas estruturais frequentes do cromossoma 10.³⁰ Estes rearranjos são os que mais frequentemente envolvem o proto-oncogene *RET* no CPT, mas pelo menos 15 tipos diferentes foram identificados até à data, sendo que todos eles resultam na produção de proteínas quiméricas, com actividade de tirosina-cínase constitutiva, que contribuem para o desenvolvimento de um fenótipo maligno.¹²⁵

A evidência mais recente sugere que os rearranjos *RET/PTC* possam ser um evento muito precoce no desenvolvimento de cancro da tireóide, havendo uma elevada prevalência de expressão de *RET/PTC* no microcarcinoma papilar da tireóide ou CPT oculto.⁴

A incidência de rearranjos do proto-oncogene *RET* é mais elevada em crianças e jovens, grupo que atinge aproximadamente 60%.¹⁰ No caso particular das crianças com história de radioterapia ou aquelas no contexto do acidente nuclear de Chernobyl de 1986, esse valor aumenta para os 80%.^{1,7,30,125-130} Nos carcinomas da tireóide relacionados com o acidente de Chernobyl, constatou-se que os rearranjos *RET/PTC3* são os mais comuns, pelo menos para a “primeira onda” de casos a surgir neste contexto, enquanto que a translocação *RET/PTC1* parece predominar nos casos pós-Chernobyl com um período de latência maior.³

O gene *NTRK*, localizado no cromossoma 1, é responsável por codificar um receptor de alta afinidade NGF, que participa na activação da via de sinalização RAF-MEK-ERK.¹³¹ Encontra-se sujeito, de modo semelhante ao *RET*, a rearranjos cromossómicos que produzem a fusão da parte final do gene 3' do *NTRK1* com a região 5' de outros genes heterólogos.³ São, porém, rearranjos pouco frequentes, normalmente encontrados em menos de 10% dos casos de CPT.¹⁰

Mutações do gene *RAS*

As mutações do gene *RAS* são uma causa comum e clássica de activação aberrante da via de sinalização MAPK em cancros humanos. Os proto-oncogenes *RAS* são componentes chave na regulação do crescimento e diferenciação celulares.

Três isoformas do *RAS* (*HRAS*, *KRAS* e o *NRAS*) estão frequentemente envolvidos na carcinogénese (cerca de 15% de todos os tumores humanos têm mutações destes genes), sendo as mutações do *RAS* as mais prevalentes nas neoplasias em geral.^{3,10,132}

A activação do *RAS* pode ocorrer directamente (através de mutações do DNA) ou indirectamente (através da activação de receptores tirosina-cínase). As mutações pontuais são as mais comuns, ocorrendo geralmente no domínio de ligação ao GTP (correspondente aos codões 12 e 13) e no domínio da GTPase (correspondente ao codão 61), embora estejam descritas outros tipos de mutações, incluindo amplificações e polimorfismos adquiridos.^{2,10,54}

Estas alterações epigenéticas traduzem-se na produção de proteínas RAS constitutivamente activas, funcionando como transdutores de sinal intracelular que podem activar várias vias de sinalização a jusante, nomeadamente a clássica via da MAPK.¹³³

Em termos de prevalência das mutações dos genes *RAS* nas neoplasias da tireóide, pode-se constatar que são particularmente frequentes nos tumores foliculares (adenoma / carcinoma folicular da tireóide) e menos frequentes no CPT (10-15%), nomeadamente na variante folicular (VFCPT).^{2,10,54,134} Contudo, a sua prevalência é variável e controversa entre séries distintas, provavelmente por diferenças no que concerne à metodologia e classificações histológicas utilizadas pelos diferentes autores.¹³⁵

As mutações associadas ao carcinoma papilar da tireóide (e outras lesões tireoideias em geral) envolvem predominantemente os codões 61 do *NRAS* e, em menor extensão, o *HRAS*.^{38,136}

Rearranjos do *PAX8-PPAR γ*

O PAX8 é um factor de transcrição importante na regulação do crescimento, diferenciação e função da tireóide. O receptor nuclear PPAR γ é um factor de transcrição dependente de ligando, que é expresso em níveis elevados no tecido adiposo.¹³⁴

A translocação cromossómica equilibrada t(2;3) (q13;p25) leva à formação de um gene de fusão, o *PAX8-PPAR γ* , resultando na perda de função do PAX8 como factor de diferenciação, e do PPAR γ como factor de diferenciação tireoideu e factor apoptótico.^{10,30,54}

Inicialmente, o mRNA *PAX8-PPAR γ* e a proteína correspondente foram detectados apenas no carcinoma folicular da tireóide (30-40%), não tendo sido encontradas no adenoma folicular ou no carcinoma papilar, o que levou a que fossem consideradas como um marcador de carcinoma folicular da tireóide.¹³⁷ Contudo, esta alteração genética foi mais tarde descrita em 5% dos AFT, pelo que se excluiu a possibilidade de considerar o *PAX8-PPAR γ* como um indicador molecular de malignidade.^{138,139}

Mais recentemente, verificou-se pela primeira vez a presença do gene de fusão *PAX8-PPAR γ* numa percentagem relativamente alta (37,5%) de casos de variante folicular do carcinoma papilar da tireóide.^{3,38}

ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NO CARCINOMA PAPILAR DA TIREÓIDE

O carcinoma papilar da tireóide representa um grupo heterogéneo de neoplasias, constituído por diferentes variantes histológicas que partilham as características nucleares peculiares que são diagnósticas. Apesar da sua classificação comum como carcinomas papilares, parece existir uma tendência para a associação entre histotipos de CPT e alterações genéticas particulares.^{3,14,54}

As mutações *BRAF* não se encontram distribuídas de forma aleatória pelos histotipos do carcinoma papilar (Fig.2).

O *BRAF*^{V600E}, que é a mutação mais prevalente neste tipo de neoplasias, está sobretudo presente em casos de carcinomas com arquitectura papilar, nomeadamente a forma clássica, a variante de células altas e o microcarcinoma papilar (com padrão predominante de crescimento papilar). Contrastando com esta evidência, está o facto de carcinomas papilares da tireóide com arquitectura folicular, nomeadamente a variante folicular e casos de microcarcinoma papilar (com padrão predominante de crescimento folicular), não apresentarem, ou apresentarem em pequena quantidade, mutações *BRAF*^{V600E} (vide Tab.1).^{3,26,54}

O *BRAF*^{K601E}, por sua vez, foi associado exclusivamente à variante folicular de CPT, estando presente em 7-9% dos casos.^{37,43}

Um outro tipo de mutação descrita, a *BRAF*^{VK600-1E}, foi detectado num caso de variante sólida do CPT, bem como em metástases ganglionares de 3 casos de carcinoma papilar da tireóide. Por fim, encontrou-se associação entre a *BRAF*^{V599Ins} e a forma clássica de CPT.^{3,26}

O rearranjo *RET/PTC* mais frequente (*RET/PTC1*) está relacionado com casos de CPT com histotipo clássico^{140,141}, ao passo que o rearranjo génico *RET/PTC3* se associa frequentemente com a variante sólida (sobretudo no contexto pós-Chernobyl)^{128,142}, mas também com a variante de células altas¹⁴³.

As mutações do RAS (sobretudo no codão 61 do *NRAS* e *HRAS*) estão também associadas a um histotipo tumoral, sendo particularmente frequentes nos casos de variante folicular do CPT (25-100%).^{10,38,76,136} Da mesma forma, constatou-se uma frequência aumentada de rearranjos *PAX8-PPARγ* (37,5%) em casos da variante folicular de CPT.^{3,54}

Estes diferentes dados disponíveis, a favor da associação genótipo-fenótipo, poderão ser úteis sobretudo no que concerne às questões clínicas que se colocam por vezes face ao diagnóstico e prognóstico de CPT.

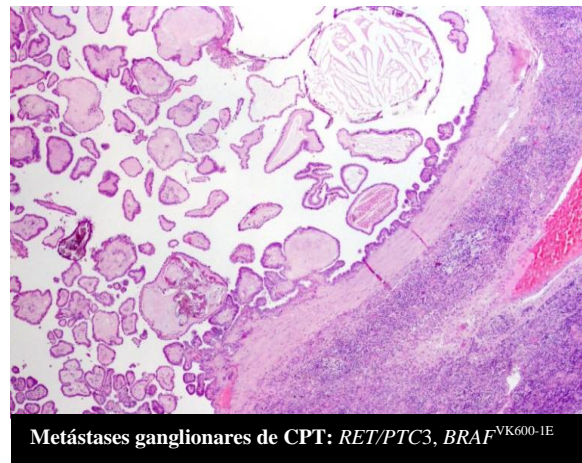
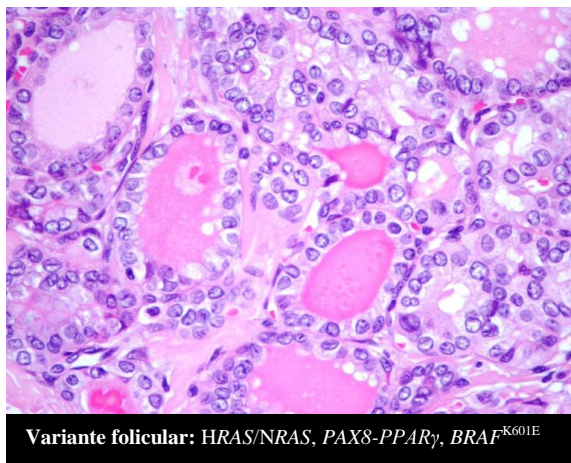
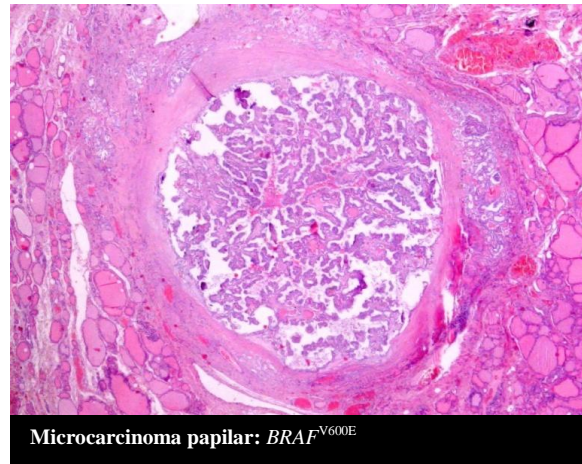
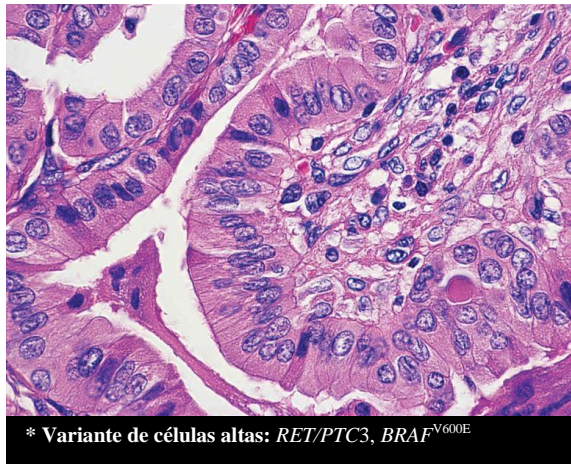
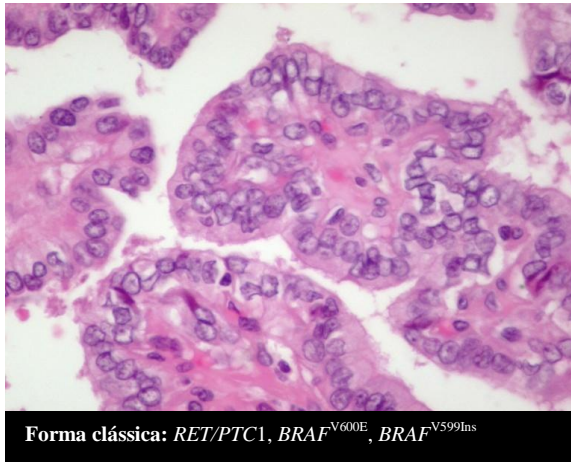


Figura 2. Associação de determinadas alterações genéticas, com certos fenótipos de CPT.

* Adaptado de PathConsult DDX Fundamentals, 2005 ¹⁴⁴

APLICAÇÃO CLÍNICA DAS MUTAÇÕES DO GENE *BRAF*

Relevância diagnóstica do *BRAF* mutado

A citologia obtida por biópsia aspirativa com agulha fina é o método mais sensível e específico para identificação de nódulos tireoideus malignos. Em centros especializados, a sua acuidade diagnóstica aproxima-se dos 98%, com taxas de falsos positivos e falsos negativos, inferiores a 2%.^{16,145} Contudo, sabe-se que cerca de 15% das citologias dos nódulos tireoideus obtidas por BAAF são inadequadas para diagnóstico, e que, em 10% dos casos, é impossível determinar com certeza se o nódulo é benigno ou maligno, geralmente envolvendo casos de tumores foliculares ou de células de Hürthle. Importa acrescentar que 20% das BAAF com achados indeterminados ou inconclusivos e 10% das BAAF não diagnósticas são, em última instância, diagnosticados como malignos após estudo histológico.¹⁴⁵

Vários investigadores sugeriram, assim, testar certas mutações de oncogenes e genes supressores tumorais com o objectivo de melhorar a acuidade diagnóstica da BAAF e respectivo exame citológico.⁹

A alta prevalência de mutações do gene *BRAF* e a sua elevada especificidade (valor preditivo positivo: 100%) nos carcinomas papilares da tireóide, bem como a facilidade da sua detecção a partir de DNA tumoral, tornaram-no o candidato ideal para melhorar a fiabilidade dos diagnósticos baseados na citologia aspirativa de nódulos tireoideus.^{57,59,61,63,99,146-148} Além disso, constatou-se que, testando a mutação *BRAF*^{V600E} em citologias aspirativas classificadas como indeterminadas e/ou suspeitas, em 16-42% dos casos se confirmava o diagnóstico de carcinoma papilar da tireóide.^{61,82,146,147}

Convém, no entanto, referir que, embora reconhecendo que em alguns casos a detecção da mutação *BRAF* pode, de facto, facilitar o diagnóstico pré-operatório de neoplasias tireoideias, é importante ter em conta que a vasta maioria de tumores *BRAF* positivos são carcinomas papilares com histotipo clássico ou de células altas, que são facilmente diagnosticados na citologia. Por outro lado, a variante folicular, que frequentemente coloca dificuldades diagnósticas em biópsia aspirativa, raramente apresenta mutação *BRAF*.^{3,26,34}

Existem ainda outros factores que desvalorizam a pesquisa desta mutação para fins diagnósticos. Em primeiro lugar as mutações do gene *BRAF* são raramente identificadas nas citologias aspirativas não diagnósticas, provavelmente devido a níveis insuficientes de DNA tumoral nas preparações provenientes do aspirado.^{57,147} Um segundo factor contra tem que ver com a baixa prevalência de mutações *BRAF* nas citologias aspirativas indeterminadas,

variando, consoante os estudos, entre os 8-16%.^{57,59,61,63,99,146-148} Por fim, em terceiro lugar, a sensibilidade da análise da mutação *BRAF* para fins diagnósticos é limitada (baixo valor preditivo negativo) e achados negativos, que ocorrem em cerca de 50% dos doentes com carcinoma papilar da tireóide, não poderão excluir a presença de neoplasia maligna.¹⁵

Sabe-se que aproximadamente metade de todos os CPT não apresentam a mutação *BRAF* (Tab.1), e esse valor aumenta se nos focarmos na citologia aspirativa indeterminada, que envolve habitualmente carcinomas foliculares da tireóide (sem associação com mutações *BRAF*) ou variantes foliculares de CPT (nas quais a mutação é rara).¹⁵

Estes dados indicam, portanto, que o *BRAF* mutado apresenta isoladamente um valor pouco consistente para melhorar a acuidade diagnóstica da citologia por biópsia aspirativa.² Provavelmente seria útil que a pesquisa do *BRAF* mutado fosse incluída num painel de testes para outros marcadores moleculares (e.g. rearranjos *RET*, *NTRK1*, *PAX8-PPAR γ* e mutações pontuais do *RAS*).¹⁵ Aliás, num estudo prospectivo¹⁴⁹ de 437 citologias aspirativas de 371 doentes, o teste combinado de vários marcadores moleculares (*BRAF*, *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *RAS* e *PAX8-PPAR γ*) revelou a presença de 21 casos de mutação (12 *BRAF*, 3 *RET/PTC1*, 2 *RET/PTC3*, 3 *HRAS*, 1 *NRAS*), permitindo desta forma a reclassificação do diagnóstico da citologia aspirativa para malignidade, em 9 casos. Assim, a combinação de citologia com a pesquisa de um conjunto de marcadores moleculares permitiu uma melhoria significativa na exactidão do diagnóstico, bem como uma melhor predição de malignidade, em nódulos com citologia indeterminada.¹⁴⁹

Tal como acontece com todas as pesquisas moleculares, os resultados são mais úteis e válidos quando interpretados no contexto do diagnóstico citológico e histológico. Por esse motivo acredita-se que, no caso particular do cancro da tireóide, esses testes venham a ser usados como ensaios complementares com o objectivo de refinar o diagnóstico e não o contrário, ou seja, fazer diagnósticos na ausência de critérios citológicos/histológicos.⁵⁴

Relevância prognóstica do *BRAF* mutado

Os carcinomas papilares da tireóide raramente causam a morte dos doentes, pois para além de geralmente serem biologicamente indolentes, habitualmente respondem muito bem aos tratamentos actualmente disponíveis (exérese cirúrgica da tireóide e tratamento complementar com iodo radioactivo). Porém, alguns casos têm um comportamento mais agressivo e outros podem inclusivamente progredir para um carcinoma anaplásico, que é uma neoplasia letal.¹⁵

A avaliação clínico-patológica convencional é actualmente a base sobre a qual é exercida a estratificação do risco para pacientes com cancro da tireóide¹⁴, considerando-se factores clássicos de alto risco: a idade avançada do doente na altura do diagnóstico, o grande tamanho tumoral, a invasão extra-tireoideia, a metastização ganglionar e, principalmente, à distância.¹⁵⁰⁻¹⁵⁴

No caso particular do carcinoma papilar, o histotipo é também um importante factor na avaliação do risco, podendo-se ordenar, de acordo com a agressividade tumoral, da seguinte forma: VCACPT > FCCPT \approx VFCPT.¹⁷

Cada um destes factores de risco clínico-patológicos parece estar associado com um aumento do risco de progressão, recidiva e, inclusive, morbilidade e mortalidade associadas ao cancro da tireóide, porém não são inteiramente seguros a predizer essas condições.¹³

A identificação de carcinomas papilares com prognóstico reservado, constitui actualmente uma abordagem importante para se poder determinar a “agressividade” com que se deve lidar com esta neoplasia, seja no que concerne à extensão do tratamento inicial (e.g. complementar a tireoidectomia com ablação com iodo radioactivo), mas também ao grau de vigilância no seguimento subsequente do doente (e.g. *follow-up* mais apertado).^{152,155} Tal facto explica a expressiva aposta na investigação de novos marcadores genéticos que possam influenciar os resultados a esse nível.³ Nos últimos anos, a mutação *BRAF* tem sido amplamente estudada como “marcador” útil em termos de valor prognóstico, no contexto de cancro da tireóide. Contudo, apesar de se acreditar que o *BRAF* mutado pode representar um promissor “marcador” de CPT, a correlação desta mutação com resultados clínicos obtidos em diversos estudos tem sido objecto de alguma controvérsia.^{13,14}

Vários estudos funcionais (usando ratinhos transgénicos ou linhagens celulares tireoideias com a mutação *BRAF*^{V600E}) e estudos clínico-patológicos, apontam para uma maior agressividade nos casos de carcinoma papilar da tireóide com presença da mutação. Nesse âmbito, alguns grupos reportaram inclusivamente uma associação entre a mutação *BRAF* e indicadores de mau prognóstico, nomeadamente, a idade avançada à data do diagnóstico^{37,48,66,69,76,96,97}, maior incidência no género masculino^{55,83}, a presença de extensão extra-tireoideia^{48,72,76-78,82,86,100,102,103,112,114,116,121}, metástases ganglionares^{62,72,75,82,86,97,100,103,112,114-116,121,122} ou à distância^{49,96} e recidiva tumoral^{72,77,83,96,122}. Contudo, outros não encontraram evidência suficiente para apoiar essas correlações (Tab.2).

A associação entre a idade e o género do doente com a mutação *BRAF* tem sido alvo de controvérsia considerável. Nikiforova *et al.*, 2003⁴⁸ reportaram uma associação forte e estatisticamente significativa com o factor idade, nomeadamente a idade avançada

($P=0,0001$), ao passo que noutro estudo, realizado por Xu *et al.*, 2003⁵⁵, se constatou uma correlação entre a mutação e pacientes do género masculino (M=64% vs F=27%, $P=0,038$)

No que diz respeito ao factor “tamanho da neoplasia”, a situação é controversa. Jo *et al.*, 2006⁸¹, constataram que os CPT com *BRAF* mutado, eram de maiores dimensões, ($P=0,01$), em oposição ao estudo de Xing *et al.*, 2005⁷², que sugeriu que o tamanho tumoral em carcinomas papilares com mutação era substancialmente mais reduzido que naqueles com *BRAF* não mutado. Este último achado iria de encontro, a uma grande prevalência de mutações *BRAF* nos microcarcinomas papilares da tireóide, encontrada noutro estudo.¹⁸

Lee *et al.*,¹³ numa metanálise publicada em 2007, referem que o *BRAF* mutado parece, de facto, ser um indicador prognóstico negativo no carcinoma papilar da tireóide. Nesta análise, constata-se a associação com factores como: (1) histotipo, sobretudo a variante de células altas (OR 4,319; 95% IC:1,970-9,469; $P=0,000$), mas também com a variante clássica (OR 3,521; 95% IC:2,506-4,948; $P=0,000$) e uma associação fraca com a variante folicular (OR 0,153; 95% IC:0,097-0,242; $P=0,000$), sugerindo que esta mutação desempenhe um papel mais importante na tumorigénese da variante de células altas e do tipo clássico, do que com outros tipos; (2) extensão extra-tireoideia (OR 1,958; 95% IC:1,515-2,530; $P=0,000$); (3) metastização ganglionar (OR 1,500; 95% IC:0,992-2,268; $P=0,055$), traduzindo-se numa associação com significado *borderline*. Porém, não foram encontradas correlações entre a mutação e factores como a raça, idade e género do paciente, ou o tamanho do tumor. Numa outra metanálise mais recente, Xing *et al.*, 2007¹⁴ corroboram, igualmente, a existência de associações positivas entre a mutação *BRAF* e: (1) extensão extra-tireoideia (OR 2,50; 95% IC:2,11-2,97; $P<0,001$); (2) metastização ganglionar (OR 1,83; 95% IC:1,58-2,13; $P<0,001$), sendo que o *BRAF* mutado foi por vezes encontrado em CPT metastizados para os gânglios linfáticos, sem contudo estar presente no tumor primário, levantando a hipótese de que possa ter ocorrido *de novo* nas células neoplásicas já metastizadas.² Estes estudos apoiam as prevalências médias, obtidas através dos dados compilados nas tabelas 1 e 2.

É importante mencionar que uma grande parte dos estudos publicados não encontrou correlação estatisticamente significativa entre a mutação *BRAF* e metástases à distância^{48,73,75,77,81,91,104,106,107,113,122}, provavelmente devido à fraca metastização do carcinoma papilar para órgãos como pulmões, ossos e SNC, pelo que poucos estudos terão um número de casos suficiente e passível de ser estudado. Contudo, os dois grandes estudos^{49,96} que observaram essa questão, encontraram uma fraca associação, embora estatisticamente significativa ($P=0,033$ e $P=0,045$, respectivamente), (Tab.2).

Tabela 2. Correlação da mutação $BRAF^{V600E}$ com características clínico-patológicas convencionais do CPT

Estudo no.	Invasão extra-tireoideia			Metastização ganglionar			Metastização à distância			Recidiva tumoral			Referência
	$BRAF^{V600E}$	$BRAF^{WT}$	P *	$BRAF^{V600E}$	$BRAF^{WT}$	P *	$BRAF^{V600E}$	$BRAF^{WT}$	P *	$BRAF^{V600E}$	$BRAF^{WT}$	P *	
1	4/21 (19)	7/35 (20)	>0,05	7/21 (33)	6/35 (17)	0,288	-	-	-	-	-	-	Xu, 2003 ⁵⁵
2	14/38 (37)	24/88 (27)	0,286	21/38 (55)	54/88 (61)	0,523	7/38 (18)	5/88 (6)	0,033	-	-	-	Namba, 2003 ⁴⁹
3	16/38 (42)	13/66 (20)	0,03	23/38 (61)	29/66 (44)	0,15	2/38 (5)	1/66 (2)	0,55	-	-	-	Nikiforova, 2003 ⁴⁸
4	10/22 (45)	10/29 (34)	0,655	8/23 (35)	16/33 (48)	0,328	-	-	-	-	-	-	Puxeddu, 2004 ⁵⁸
5	10/18 (56)	17/29 (59)	>0,05	12/16 (75)	13/23 (57)	0,3	-	-	-	5/18 (28)	5/29 (17)	0,47	Fugazzola, 2004 ⁶⁰
6	7/19 (37)	16/39 (41)	-	5/13 (38)	8/15 (53)	-	-	-	-	-	-	-	Salvatore, 2004 ⁶¹
7	28/58 (48)	7/12 (58)	0,795	39/58 (67)	4/12 (33)	0,048	-	-	-	-	-	-	Kim, 2004 ⁶²
8	7/21 (33)	10/53 (19)	0,182	11/21 (52)	18/53 (34)	0,143	-	-	-	-	-	-	Trovisco, 2005 ³⁷
9	33/64 (52)	8/15 (53)	0,947	24/64 (38)	7/15 (47)	0,513	-	-	-	-	-	-	Kim, 2005 ⁶⁹
10	15/31 (48)	11/29 (38)	0,45	21/31 (68)	15/29 (52)	0,06	-	-	-	2/31 (6)	0/29 (0)	0,49	Kim, 2005 ⁴⁵
11	44/107 (41)	18/112 (16)	<0,001	58/107 (54)	24/112 (21)	<0,001	-	-	-	23/92 (25)	9/96 (9)	0,004	Xing, 2005 ⁷²
12	26/47 (55)	26/54 (48)	0,472	17/47 (36)	24/54 (44)	0,3983	0/47 (0)	4/54 (7)	0,058	-	-	-	Liu, 2005 ⁷³
13	7/18 (39)	14/19 (74)	>0,05	0/18 (0)	7/19 (37)	0,01	0/18 (0)	1/19 (5)	0,33	2/11 (18)	4/11 (36)	<0,5	Sapio, 2006 ⁷⁵
14	16/40 (40)	8/57 (14)	0,004	21/40 (53)	29/57 (51)	0,875	2/40 (5)	2/57 (4)	-	-	-	-	Adeniram, 2006 ⁷⁶
15	18/28 (64)	11/39 (28)	0,003	9/28 (32)	9/39 (23)	0,42	1/28 (4)	1/39 (3)	0,06	9/28(32)	3/39(8)	0,02	Riesco, 2006 ⁷⁷
16	32/58 (55)	14/42 (33)	0,031	14/58 (24)	10/42 (24)	0,970	-	-	-	-	-	-	Lee, 2006 ⁷⁸
17	8/31 (26)	2/27 (7)	<0,05	15/31 (48)	7/27 (26)	<0,05	-	-	-	-	-	-	Jin, 2006 ⁸² †
18	68/102 (67)	31/59 (53)	0,08	49/102 (48)	27/59 (46)	0,78	1/102 (1)	1/59 (2)	0,69	-	-	-	Jo, 2006 ⁸¹
19	107/149 (72)	31/54 (57)	0,062	116/149 (78)	37/54 (69)	0,389	-	-	-	32/149 (21)	4/54 (7)	0,037	Kim, 2006 ⁸³
20	34/53 (64)	5/8 (63)	0,928	21/53 (40)	2/8 (25)	0,426	-	-	-	-	-	-	Park, 2006 ⁸⁵
21	8/9 (89)	30/94 (32)	<0,0001	26/34 (76)	12/69 (17)	<0,0001	-	-	-	-	-	-	Kim, 2006 ⁸⁶
22	7/28 (25)	3/14 (21)	>0,9999	19/28 (68)	10/14 (71)	>0,9999	-	-	-	-	-	-	Zuo, 2007 ⁸⁷
23	12/24 (50)	7/20 (35)	0,37	10/24 (42)	11/20 (55)	0,22	-	-	-	-	-	-	Abrosimov, 2007 ⁸⁸
24	14/56 (25)	12/36 (33)	0,38	16/55 (29)	12/37 (32)	0,73	3/37 (8)	6/31 (19)	0,13	-	-	-	Durante, 2007 ⁹¹
25	24/111 (22)	20/98 (20)	0,8013	53/111 (48)	32/98 (33)	0,0660	-	-	0,045	38/111 (34)	18/98 (18)	0,01	Kebebew, 2007 ⁹⁶ †
26	-	-	-	23/88 (26)	19/126 (15)	0,034	-	-	-	-	-	-	Rodolico, 2007 ⁹⁷
27	-	-	-	2/11 (18)	1/5 (20)	-	-	-	-	-	-	-	Pizzolanti, 2007 ⁹⁹
28	82/214 (38)	47/286 (16)	<0,0001	34/214 (16)	19/286 (7)	<0,0001	-	-	-	-	-	-	Lupi, 2007 ¹⁰⁰
29	-	-	-	2/15 (13)	8/40 (20)	0,710	-	-	-	-	-	-	Goutas, 2008 ¹⁰¹
30	30/54 (56)	18/54 (33)	0,02	18/54 (33)	16/54 (30)	0,67	-	-	-	-	-	-	Wang, 2008 ¹⁰²
31	51/125 (41)	36/198 (18)	<0,0001	40/125 (32)	27/198 (14)	0,0001	-	-	-	-	-	-	Frasca, 2008 ¹⁰³
32	-	-	-	-	-	0,083	-	-	>0,17	-	-	0,075	Costa, 2008 ¹⁰⁴
33	21/40 (53)	24/43 (56)	0,93	24/40 (60)	19/43 (44)	0,21	1/40 (3)	2/43 (5)	0,97	-	-	-	Barzon, 2008 ¹⁰⁶
34	5/35 (14)	7/62 (11)	0,6	17/37 (46)	23/63 (37)	0,3	3/37 (8)	3/63 (5)	0,5	-	-	-	Elisei, 2008 ¹⁰⁷
35	18/34 (53)	4/9 (44)	-	26/36 (72)	3/11 (27)	-	1/42 (2)	0/12 (0)	-	-	-	-	Henderson, 2009 ¹¹⁰
36	12/24 (50)	4/40 (10)	0,001	12/40 (50)	6/40 (15)	0,003	-	-	-	-	-	-	Lee, 2009 ¹¹²
37	-	-	-	173/242 (71)	266/389 (68)	>0,05	1/242 (0,4)	3/389 (0,8)	>0,05	18/242 (7)	33/389 (8)	-	Ito, 2009 ¹¹³
38	26/54 (48)	14/60 (23)	0,0056	35/58 (60)	16/62 (26)	0,0001	-	-	-	-	-	-	Oler, 2009 ¹¹⁴
39	-	-	-	22/24 (92)	10/19 (53)	<0,01	-	-	-	-	-	-	Baitei, 2009 ¹¹⁵
40	77/515 (15)	22/284 (8)	0,003	198/515 (38)	81/284 (29)	0,005	-	-	-	-	-	-	Guan, 2009 ¹¹⁶
41	2/3 (67)	3/11 (27)	-	2/3 (67)	5/11 (45)	-	1/3 (33)	0/11 (0)	-	-	-	-	Chuang, 2009 ¹¹⁸
42	(44)	(31)	>0,05	(35)	(37)	>0,05	-	-	-	-	-	-	Zatelli, 2009 ¹¹⁹
43	56/99 (57)	15/100 (15)	<0,0001	42/83 (51)	18/69 (26)	0,003	-	-	-	4/11 (36)	0/3 (0)	-	Yip, 2009 ¹²¹
44	30/72 (42)	42/136 (31)	0,128	31/65 (48)	44/141 (31)	0,029	3/65 (5)	9/126 (7)	0,754	8/67 (12)	3/133 (2)	0,008	Sykorova, 2009 ¹²²
Total	979/2460 (40)	591/2411 (25)	-	1316/2858 (46)	1004/2919 (34)	-	26/777 (3)	38/1057 (4)	-	141/760 (19)	79/881 (9)	-	

Dados representam [número/total (%)]. $BRAF^{V600E}$ (gene $BRAF$ mutado); $BRAF^{WT}$ (gene $BRAF$ do tipo “selvagem”).

* Um valor $P < 0,05$ denota a presença de uma associação estatisticamente significativa (evidenciado a **negrito**). Este valor permite avaliar a associação da mutação $BRAF$ com uma ou mais características clínico-patológicas convencionais de alto risco do CPT. Todas as variáveis foram estudadas de forma isolada (análise univariada).

† Dados omissos nos trabalhos originais, obtidos por intermédio de um estudo de metanálise de Xing MZ, 2007.¹⁴

No que respeita à associação *BRAF* mutado e recidiva tumoral, esta foi avaliada em vários estudos que apresentavam um tamanho amostral adequado. Um estudo multicêntrico norte-americano, conduzido por Xing *et al.*, 2005⁷², num período de *follow-up* médio de 15 meses, no qual foi analisada retrospectivamente a recidiva tumoral em CPT primários, constatou-se uma associação próxima entre a mutação e existência da recidiva tumoral ($P=0,004$), associação essa que continuava a existir e permanecia estatisticamente significativa, mesmo após ter sido feita uma análise multivariada, ajustada aos mais comuns factores clínico-patológicos de “confusão” (incluindo subtipos histológicos e história de tratamento com iodo radioactivo), com uma *odds ratio* de 4,0 (95% IC: 1,1-14,1; $P=0,03$). Da mesma forma, um outro estudo norte-americano, com *follow-up* médio de 72 meses, realizado por Kebebew *et al.*, 2007⁹⁶, confirmou uma correlação sólida desses dois factores (OR 2,31; 95% IC: 1,21-4,41; $P=0,01$) que, tal como no estudo anterior, permaneceu significativa mesmo após análise multivariada ajustada aos preditores clínico-patológicos mais convencionais de recidiva. De forma análoga, outros dois estudos revelaram a associação próxima entre o *BRAF* mutado e a taxa de recidiva, nomeadamente: um estudo coreano, realizado por Kim *et al.*, 2006⁸³, com tempo de seguimento médio de 88 meses, ($P=0,037$), e um estudo espanhol, executado por Riesco-Eizaguirre *et al.*, 2006⁷⁷, com um período de *follow-up* de 36 meses, ($P=0,02$). Num estudo muito recente, Sykorova *et al.*, 2009¹²², que também avaliou a presença de *BRAF* mutado em amostras de CPT referentes a 242 pacientes, alusivas ao período de 1960-2007, evidenciou uma associação forte e estatisticamente significativa entre a mutação e a recidiva tumoral ($P=0,008$), tendo a análise multivariada apoiado este resultado (Tab.2).

Ainda no mesmo seguimento, reconheceu-se uma incidência significativamente elevada de perda da avidéz pelo iodo radioactivo no carcinoma papilar da tireóide recidivante com mutação *BRAF* presente, sugerindo que esta poderá predizer, não só uma maior taxa de recidiva neoplásica de CPT, mas também uma resposta mais débil aos tratamentos com iodo radioactivo, em caso de recidiva tumoral.³⁶

Em suma, a mutação *BRAF* pode vir a tornar-se num marcador de prognóstico informativo, que poderá ser prontamente detectado no material citológico após BAAF, tendo o potencial de melhorar a estratificação de risco e a predição de recidiva tumoral em pacientes afectados com CPT, permitindo decisões mais bem informadas acerca da conduta terapêutica inicial e a longo prazo. Porém, para confirmar este pressuposto, serão necessários estudos multicêntricos prospectivos, de forma a clarificar o papel da mutação *BRAF* como indicador clínico útil da agressividade do carcinoma papilar.^{2,12,26}

Se estes estudos confirmarem a eficácia do *BRAF* mutado na estratificação prognóstica de pacientes com CPT, é concebível que, no futuro, a genotipagem pré-operatória de material proveniente de citologias aspirativas possa alterar a abordagem cirúrgica e as modalidades de tratamento com iodo radioactivo, provavelmente implementando uma dissecação ganglionar mais agressiva e o uso de doses mais elevadas de iodo radioactivo nos carcinomas papilares *BRAF* positivos, podendo, ainda, condicionar um *follow-up* mais apertado e, eventualmente, o uso de modalidades de imagem como a PET, para pesquisar persistência/recidiva tumoral.¹²

BRAF COMO ALVO TERAPÊUTICO NO CPT

Embora o cancro da tireóide tenha habitualmente um curso indolente e seja curável com os tratamentos *standard* actuais (tireoidectomia total com ou sem esvaziamento ganglionar cervical, e terapêutica adjuvante com iodo radioactivo), existe, contudo, uma minoria de pacientes com doença incurável, associada a morbilidade e mortalidade elevadas.

Os casos mais difíceis, para os quais não existe um tratamento eficaz actualmente, dizem respeito àqueles inoperáveis ou que perderam a afeição pelo iodo radioactivo, nomeadamente os carcinomas anaplásicos da tireóide, que são frequentemente positivos para a mutação *BRAF*.³⁶

A elevada frequência destas mutações nos carcinomas papilares e o seu importante papel na iniciação tumoral e desdiferenciação, bem como a provável associação com a recidiva tumoral e resistência à terapêutica com iodo radioactivo, fazem do *BRAF* mutado um alvo lógico e importante do tratamento com fármacos anti-neoplásicos.^{1,2} Estas terapêuticas dirigidas a certos alvos, no contexto oncológico, tendem a ser mais eficazes quando o composto terapêutico inibe uma via que está constitutivamente activada durante os estadios iniciais do desenvolvimento tumoral.^{47,156}

A inibição molecular do BRAF mostrou-se eficaz em abrandar a proliferação de várias linhagens celulares tireoideias, incluindo algumas com expressão de *BRAF*^{V600E}.¹⁵⁷

Dos vários inibidores multicínase conhecidos, o BAY 43-9006 (conhecido como sorafenib), é um fármaco que bloqueia eficazmente a actividade cinásica do BRAF, seja do tipo “selvagem” ou do tipo mutado, inibindo a via de sinalização do BRAF, no contexto da cascata intracelular MAPK.^{2,24,158}

Encontra-se associado a atrasos no crescimento celular, sobretudo devido ao seu efeito citostático, com consequente paragem celular em fase G1, e está igualmente relacionado com

a morte celular, provavelmente mediada pela inibição de outras cínases, sobretudo aquelas envolvidas na angiogénese.^{2,159} Este fármaco também apresenta actividade relevante contra VEGFR2 e VEGFR3, PDGFR β , Flt-3, c-Kit e RET.^{2,157,158}

Foi utilizado num ensaio clínico de fase II na dose de 400mg, duas vezes por dia, em 30 doentes com carcinomas tireoideus refractários (60% papilares, 30% foliculares, 3% medulares, 7% anaplásicos ou indiferenciados), tendo 23% dos doentes apresentado resposta parcial e 53% mantido a neoplasia estável, com um tempo médio sem progressão de 21 meses.¹⁵⁸ Outro ensaio, realizado apenas em doentes com carcinoma papilar (grupo amostral de 41 doentes), conduziu a respostas parciais em 15% e estabilização em 56% dos casos, com um tempo médio sem progressão da doença de 15 meses.¹⁵⁸

É importante sublinhar que não existe actualmente evidência de que a inibição do BRAF integra, de facto, os efeitos anti-tumorais do sorafenib, pois como foi referido, este fármaco pode também interferir com outros alvos moleculares (outras cínases), com papéis conhecidos na tumorigénese (e.g. receptor do VEGF). De facto, originalmente este fármaco foi aprovado pela FDA (nos EUA) para tratamento de carcinoma de células renais e carcinomas hepatocelulares avançados, nenhum destes apresentando relação (conhecida) com a mutação *BRAF*.^{2,15,157,158}

Outros dois potentes inibidores da RAF cínase, o AAL-881 e LBT-613, têm sido testados *in vitro* e *in vivo*, constatando-se que ambos inibem a proliferação celular e induzem a apoptose, em linhagens celulares com CPT portador de *BRAF* mutado.^{2,3}

Novos dados apontam numa outra direcção, destacando o papel das chaperonas Hsp90 responsáveis por manter a estabilidade do *BRAF*^{V600E}, levantando a possibilidade de utilização de inibidores da Hsp90 (e.g. 17-AAG). Porém, serão necessários mais estudos neste âmbito para confirmar essa possibilidade.³

No que concerne à perda da capacidade de captação de iodo radioactivo, pensa-se que esta esteja relacionada com a existência de uma quantidade baixa ou nula de proteína NIS (simporte sódio-iodo).^{160,161} Esta glicoproteína, localizada na membrana basolateral das células tireoideias, é responsável pelo transporte de iodo, um passo fundamental na biossíntese de hormona tireoideia, pelo que actualmente se tem procurado criar novas formas de aumentar a sua expressão.¹⁶² De acordo com alguns ensaios clínicos com análogos do ácido retinóico, este fármaco actua aumentando a expressão de NIS, promovendo assim uma melhor captação de iodo radioactivo.^{160,161}

Existe alguma controvérsia no que respeita às vantagens relativas do uso de bloqueadores das cínases muito específicos *versus* aqueles de largo espectro, pelo que o uso combinado

desses inibidores moleculares, juntamente com quimioterapia citotóxica, é vista por muitos como a mais promissora estratégia para um tratamento eficaz no cancro indiferenciado ou muito agressivo da tireóide, devendo, contudo, ser ainda objecto de estudo.¹⁶³

Em suma, os compostos disponíveis contra diferentes moléculas que se pensa estarem envolvidas na carcinogénese do CPT, representam fármacos promissores que se encontram a ser avaliados no tratamento de pacientes com cancro da tireóide. Estes novos fármacos variam na sua especificidade e têm sido testados com relativo sucesso em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos.^{29,158} Porém, ainda não foi demonstrado um aumento da sobrevida com a utilização destes fármacos, pelo que não estão ainda aprovados para utilização fora do âmbito dos ensaios clínicos. No entanto, o seu potencial terapêutico é amplamente reconhecido, pelo que, actualmente se indica a inclusão de doentes com carcinomas da tireóide, progressivos e refractários a outras formas de terapêutica, em ensaios clínicos com estes novos fármacos.¹⁵⁸

O desafio neste momento passa por progredir na validação dos alvos terapêuticos destes compostos e na exploração da possibilidade de usar terapia combinada em doentes com carcinoma papilar da tireóide progressivo.

REFERÊNCIAS

1. Ciampi R, Nikiforov YE. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007;148:936-41.
2. Tang KT, Lee CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *J Chin Med Assoc* 2010;73:113-28.
3. Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Maximo V, Sobrinho-Simões M. Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:643-53.
4. Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:955-69.
5. Nucera C, Goldfarb M, Hodin R, Parangi S. Role of B-Raf(V600E) in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-Raf(V600E). *Biochim Biophys Acta* 2009;1795:152-61.
6. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006;295:2164-7.
7. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins & Cotran - Pathologic Basis of Disease. In: Elsevier, ed. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
8. Maciel RM, Kimura ET, Cerutti JM. [Pathogenesis of differentiated thyroid cancer (papillary and follicular)]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:691-700.
9. Shibru D, Chung KW, Kebebew E. Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Curr Opin Oncol* 2008;20:13-8.
10. Handkiewicz-Junak D, Czarniecka A, Jarzab B. Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions. *Mol Cell Endocrinol* 2010, doi:10.1016/j.mce.2010.01.007.
11. Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L. Increased incidence of thyroid carcinoma in france: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004;14:1056-60.

12. Puxeddu E, Moretti S. Clinical prognosis in BRAF-mutated PTC. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:736-47.
13. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer* 2007;110:38-46.
14. Xing MZ. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007;28:742-62.
15. Puxeddu E, Durante C, Avenia N, Filetti S, Russo D. Clinical implications of BRAF mutation in thyroid carcinoma. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:138-45.
16. Al-Brahim N, Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1057-62.
17. DeLellis R, Lloyd R, Heitz P, Eng C (editors). *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. 3rd ed. Lyon: WHO Classification of Tumours; 2004.
18. Park YJ, Kim YA, Lee YJ, et al. Papillary microcarcinoma in comparison with larger papillary thyroid carcinoma in BRAF(V600E) mutation, clinicopathological features, and immunohistochemical findings. *Head Neck* 2009.
19. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180-6.
20. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 2004;23:7436-40.
21. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:1454-7.
22. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22:4578-80.
23. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
24. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855-67.
25. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653:25-40.
26. Trovisco V, Soares P, Sobrinho-Simões M. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 2006;37:781-6.
27. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313-9.
28. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol* 2004;183:249-56.
29. Espinosa AV, Porchia L, Ringel MD. Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer* 2007;96:16-20.
30. Salehian B, Liu Z. Genetic alterations in differentiated thyroid cancers. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009;9:257-68.
31. Hubbard SR. Oncogenic mutations in B-Raf: some losses yield gains. *Cell* 2004;116:764-6.
32. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005;115:94-101.
33. Moretti S, Macchiarulo A, De Falco V, et al. Biochemical and molecular characterization of the novel BRAF(V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2006;25:4235-40.
34. Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005;16:163-72.
35. Fusco A, Viglietto G, Santoro M. A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. *J Clin Invest* 2005;115:20-3.
36. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:245-62.
37. Trovisco V, Soares P, Preto A, et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch* 2005;446:589-95.

38. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al. PAX8-PPAR γ rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:213-20.
39. Oler G, Ebina KN, Michaluart P, Jr., Kimura ET, Cerutti J. Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:509-11.
40. Trovisco V, Soares P, Soares R, Magalhaes J, Sa-Couto P, Sobrinho-Simões M. A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36:694-7.
41. Carta C, Moretti S, Passeri L, et al. Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64:105-9.
42. Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle* 2007;6:377-9.
43. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004;202:247-51.
44. Gradíssimo V. Role of the BRAF gene alterations in the natural history of papillary thyroid carcinoma. Porto: Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina do Porto; 2008.
45. Kim TY, Kim WB, Song JY, et al. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:588-93.
46. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, et al. The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int J Oncol* 2004;25:1729-35.
47. Ugolini C, Giannini R, Lupi C, et al. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2007;17:381-8.
48. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5399-404.
49. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4393-7.
50. Xing M, Vasko V, Tallini G, et al. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1365-8.
51. Kumagai A, Namba H, Saenko VA, et al. Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4280-4.
52. Lima J, Trovisco V, Soares P, et al. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4267-71.
53. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, et al. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett* 2004;209:1-6.
54. Hunt J. Understanding the genotype of follicular thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005;16:311-21.
55. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 2003;63:4561-7.
56. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 2003;22:6455-7.
57. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, et al. Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clin Cancer Res* 2004;10:2761-5.
58. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2414-20.

59. Xing M, Tufano RP, Tufaro AP, et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2867-72.
60. Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, et al. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:239-43.
61. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, et al. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5175-80.
62. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J* 2004;45:818-21.
63. Hayashida N, Namba H, Kumagai A, et al. A rapid and simple detection method for the BRAF(T1796A) mutation in fine-needle aspirated thyroid carcinoma cells. *Thyroid* 2004;14:910-5.
64. Perren A, Schmid S, Locher T, et al. BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:855-60.
65. Domingues R, Mendonca E, Sobrinho L, Bugalho MJ. Searching for RET/PTC rearrangements and BRAF V599E mutation in thyroid aspirates might contribute to establish a preoperative diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Cytopathology* 2005;16:27-31.
66. Powell N, Jeremiah S, Morishita M, et al. Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure. *J Pathol* 2005;205:558-64.
67. Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, et al. Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3028-35.
68. Rosenbaum E, Hosler G, Zahurak M, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH. Mutational activation of BRAF is not a major event in sporadic childhood papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18:898-902.
69. Kim KH, Suh KS, Kang DW, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis. *Pathol Int* 2005;55:540-5.
70. Vasko V, Hu S, Wu G, et al. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5265-9.
71. Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:6646-56.
72. Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6373-9.
73. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, et al. No correlation between BRAF V600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:461-6.
74. Collins BJ, Schneider AB, Prinz RA, Xu X. Low frequency of BRAF mutations in adult patients with papillary thyroid cancers following childhood radiation exposure. *Thyroid* 2006;16:61-6.
75. Sapio MR, Posca D, Troncone G, et al. Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol* 2006;154:341-8.
76. 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.
77. Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:257-69.
78. Lee JH, Lee ES, Kim YS, Won NH, Chae YS. BRAF mutation and AKAP9 expression in sporadic papillary thyroid carcinomas. *Pathology* 2006;38:201-4.

79. Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, De Micco C. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:485-95.
80. Matsukuma S, Yoshihara M, Kasai F, et al. Rapid and simple detection of hot spot point mutations of epidermal growth factor receptor, BRAF, and NRAS in cancers using the loop-hybrid mobility shift assay. *J Mol Diagn* 2006;8:504-12.
81. Jo YS, Li S, Song JH, et al. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3667-70.
82. Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, et al. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:136-43.
83. Kim TY, Kim WB, Rhee YS, et al. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:364-8.
84. Sargent R, LiVolsi V, Murphy J, Mantha G, Hunt JL. BRAF mutation is unusual in chronic lymphocytic thyroiditis-associated papillary thyroid carcinomas and absent in non-neoplastic nuclear atypia of thyroiditis. *Endocr Pathol* 2006;17:235-41.
85. Park SY, Park YJ, Lee YJ, et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma: evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. *Cancer* 2006;107:1831-8.
86. Kim J, Giuliano AE, Turner RR, et al. Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 2006;244:799-804.
87. Zuo H, Nakamura Y, Yasuoka H, et al. Lack of association between BRAF V600E mutation and mitogen-activated protein kinase activation in papillary thyroid carcinoma. *Pathol Int* 2007;57:12-20.
88. Abrosimov A, Saenko V, Rogounovitch T, et al. Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical BRAF status. *Int J Cancer* 2007;120:196-200.
89. Takahashi K, Eguchi H, Arihiro K, et al. The presence of BRAF point mutation in adult papillary thyroid carcinomas from atomic bomb survivors correlates with radiation dose. *Mol Carcinog* 2007;46:242-8.
90. Erickson LA, Jin L, Nakamura N, Bridges AG, Markovic SN, Lloyd RV. Clinicopathologic features and BRAF(V600E) mutation analysis in cutaneous metastases from well-differentiated thyroid carcinomas. *Cancer* 2007;109:1965-71.
91. 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.
92. Brzezianska E, Pastuszek-Lewandoska D, Wojciechowska K, et al. Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Neuro Endocrinol Lett* 2007;28:351-9.
93. Giannini R, Ugolini C, Lupi C, et al. The heterogeneous distribution of BRAF mutation supports the independent clonal origin of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3511-6.
94. Hay R, MacRae E, Barber D, Khalil M, Demetrick DJ. BRAF mutations in melanocytic lesions and papillary thyroid carcinoma samples identified using melting curve analysis of polymerase chain reaction products. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1361-7.
95. Nakayama H, Yoshida A, Nakamura Y, et al. Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas. *Anticancer Res* 2007;27:3645-9.
96. Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007;246:466-70; discussion 70-1.
97. Rodolico V, Cabibi D, Pizzolanti G, et al. BRAF V600E mutation and p27 kip1 expression in papillary carcinomas of the thyroid ≤ 1 cm and their paired lymph node metastases. *Cancer* 2007;110:1218-26.
98. Rodrigues R, Roque L, Espadinha C, et al. Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. *Oncol Rep* 2007;18:917-26.
99. Pizzolanti G, Russo L, Richiusa P, et al. Fine-needle aspiration molecular analysis for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma through BRAF V600E mutation and RET/PTC rearrangement. *Thyroid* 2007;17:1109-15.

100. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4085-90.
101. Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Bouka M, Lazaris AC, Nasioulas G, Gazouli M. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res* 2008;28:305-8.
102. Wang Y, Ji M, Wang W, et al. Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:183-90.
103. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:191-205.
104. Costa AM, Herrero A, Fresno MF, et al. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:618-34.
105. Wang YL, Wang JC, Wu Y, et al. Incidentally simultaneous occurrence of RET/PTC, H4-PTEN and BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 2008;263:44-52.
106. Barzon L, Masi G, Boschin IM, et al. Characterization of a novel complex BRAF mutation in a follicular variant papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2008;159:77-80.
107. Elisei R, Ugolini C, Viola D, et al. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3943-9.
108. Trovisco V, Couto JP, Cameselle-Teijeiro J, et al. Acquisition of BRAF gene mutations is not a requirement for nodal metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:683-5.
109. 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 (Oxf)* 2009;70:139-44.
110. Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, et al. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:485-91.
111. Kim SK, Song KH, Lim SD, et al. Clinical and pathological features and the BRAF(V600E) mutation in patients with papillary thyroid carcinoma with and without concurrent Hashimoto thyroiditis. *Thyroid* 2009;19:137-41.
112. Lee X, Gao M, Ji Y, et al. Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in high aggressive papillary thyroid microcarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;16:240-5.
113. Ito Y, Yoshida H, Maruo R, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J* 2009;56:89-97.
114. Oler G, Cerutti JM. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer* 2009;115:972-80.
115. Baitei EY, Zou M, Al-Mohanna F, et al. Aberrant BRAF splicing as an alternative mechanism for oncogenic B-Raf activation in thyroid carcinoma. *J Pathol* 2009;217:707-15.
116. Guan H, Ji M, Bao R, et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1612-7.
117. Santarpia L, Sherman SI, Marabotti A, Clayman GL, El-Naggar AK. Detection and molecular characterization of a novel BRAF activated domain mutation in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:827-33.
118. Chuang TC, Chuang AY, Poeta L, Koch WM, Califano JA, Tufano RP. Detectable BRAF mutation in serum DNA samples from patients with papillary thyroid carcinomas. *Head Neck* 2009.
119. Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S, et al. BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsies. *Eur J Endocrinol* 2009;161:467-73.
120. Pellegriti G, De Vathaire F, Scollo C, et al. Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of Sicily. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1575-83.

121. Yip L, Nikiforova MN, Carty SE, et al. Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation. *Surgery* 2009;146:1215-23.
122. Sykorova V, Dvorakova S, Ryska A, et al. BRAFV600E Mutation in the Pathogenesis of a Large Series of Papillary Thyroid Carcinoma in Czech Republic. *J Endocrinol Invest* 2009.
123. Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:441-67.
124. Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 1999;13:313-25.
125. Oncogenes and tumor suppressor genes in thyroid nodules and nonmedullary thyroid cancer. UpToDate, 2009. (Accessed November, 2009, at <http://www.uptodate.com/online/index.do>)
126. Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, et al. Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* 1995;55:5617-20.
127. Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 1995;11:2459-67.
128. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 1997;57:1690-4.
129. Smida J, Salassidis K, Hieber L, et al. Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer* 1999;80:32-8.
130. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000;6:1093-103.
131. Miller FD, Kaplan DR. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1045-53.
132. Oxford G, Theodorescu D. Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett* 2003;189:117-28.
133. Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001;93:53-62.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000;289:1357-60.
138. Cheung L, Messina M, Gill A, et al. Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:354-7.
139. 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.
140. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simões M. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 1998;185:71-8.
141. Tallini G, Santoro M, Helie M, et al. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res* 1998;4:287-94.

142. Nikiforov YE. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2002;13:3-16.
143. Basolo F, Giannini R, Monaco C, et al. Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:247-54.
144. Papillary Carcinoma. Elsevier, 2005. (Accessed 12 Jan 2010, at <http://www.pathconsultddx.com/pathCon/diagnosis?pii=S1559-8675%2806%2971560-1>)
145. Filetti S, Durante C, Torlontano M. Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:384-94.
146. Chung KW, Yang SK, Lee GK, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:660-6.
147. Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal* 2006;3:10.
148. Sapiro MR, Posca D, Raggioli A, et al. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:678-83.
149. 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.
150. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994;97:418-28.
151. DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:414-24.
152. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1447-63.
153. Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, et al. Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer* 1998;83:1012-21.
154. Tanaka K, Sonoo H, Hirono M, et al. Retrospective analysis of predictive factors for recurrence after curatively resected papillary thyroid carcinoma. *Surg Today* 2005;35:714-9.
155. Mazzaferri EL. Managing small thyroid cancers. *JAMA* 2006;295:2179-82.
156. Groussin L, Fagin JA. Significance of BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:180-1.
157. Salvatore G, De Falco V, Salerno P, et al. BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:1623-9.
158. Sousa A, Rodrigues E, Medina JL. [Tyrosine kinase inhibitors in metastatic thyroid cancer]. *Rev Port End Diab Metab* 2009;4:101-7.
159. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, et al. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:326-34.
160. Baudin E, Schlumberger M. New therapeutic approaches for metastatic thyroid carcinoma. *Lancet Oncol* 2007;8:148-56.
161. Antonelli A, Fallahi P, Ferrari SM, et al. Dedifferentiated thyroid cancer: a therapeutic challenge. *Biomed Pharmacother* 2008;62:559-63.
162. Spitzweg C, Heufelder AE. The sodium iodide symporter: its emerging relevance to clinical thyroidology. *Eur J Endocrinol* 1998;138:374-5.
163. Sebolt-Leopold JS, English JM. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature* 2006;441:457-62.