

MUTAÇÃO DO GENE BRAF NA HISTÓRIA NATURAL DO CARCINOMA PAPILAR DA TIREÓIDE

Implicações Diagnósticas e Prognósticas*

J. Pedro LOPES, E. FONSECA

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 transversão 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.

Parece, portanto, evidente que a mutação BRAF terá um impacto significativo na abordagem clínica do carcinoma papilar da tireóide.

J.P.L., E.F.: Serviço de Anatomia Patológica. Hospital S. João/ Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Porto.

E.F.: Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto. Porto. Portugal.

SUMMARY

BRAF GENE MUTATION IN THE NATURAL HISTORY OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA

Diagnostic and Prognostic Implications

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}

*Artigo de revisão sistemática realizado no âmbito de uma Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

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 were not able to confirm these associations.

It has become clearer that BRAF mutation will likely have significant impact on the clinical management of papillary thyroid carcinoma.

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 100.000 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 0,5/100.000^{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 géneros⁷.

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^{1,2,3,8-10}.

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 uma maior capacidade de detecção da 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 padrão, 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 distância¹². As recidivas podem resultar de um tratamento inicial incompleto ou da presença de um componente neoplásico agressivo¹³.

Quando esta neoplasia se torna cirurgicamente inoperável e/ou perde a avidéz para o iodo radioactivo, o paciente enfrenta uma possibilidade remota de cura, não existindo actualmente um tratamento curativo aplicável¹⁴.

Torna-se desta forma importante apostar no diagnóstico pré-cirúrgico preciso, na estratificação baseada em 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 irrisecáveis e refractários a tratamento com iodo radioactivo¹⁵.

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 císticas⁷.

A existência de múltiplas variantes morfológicas de CPT demonstra a pouca relevância da arquitectura 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

Existe portanto um leque diversificado de histotipos de CPT: a forma clássica, a variante de células altas, a variante folicular, variante sólida, o microcarcinoma papilar, a variante oncocítica, a variante colunar, a variante encapsulada e a variante esclerosante difusa.⁷ Abordar-se-ão com maior pormenor, os primeiros cinco subtipos histológicos referidos.

A **forma clássica** do CPT é caracterizada por papilas complexas que se ramificam e possuem um eixo fibrovascular revestido 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 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 folicular** apresenta os núcleos característicos do carcinoma papilar, mas tem uma arquitetura quase totalmente folicular, sem papilas^{7,16}.

A **variante sólida** é caracterizada pela existência de ninhos e trabéculas de células tumorais alongadas dentro do estroma fibrovascular, apresentando semelhanças com a variante folicular¹⁶.

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 arquitetural 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^{16,17}. Contudo, acredita-se que esta lesão quando identificada acidentalmente, seja de significado clínico mínimo, tanto mais que é um achado frequente em autópsias^{16,17}.

PATOGÉNESE MOLECULAR NO CANCRO DA TIREÓIDE

Os anos mais recentes foram marcados por uma expansão significativa da compreensão da base molecular da carcinogénese da tireóide⁸.

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^{2,5,18} (Figura 1).

Uma vez activado, o receptor TK, 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

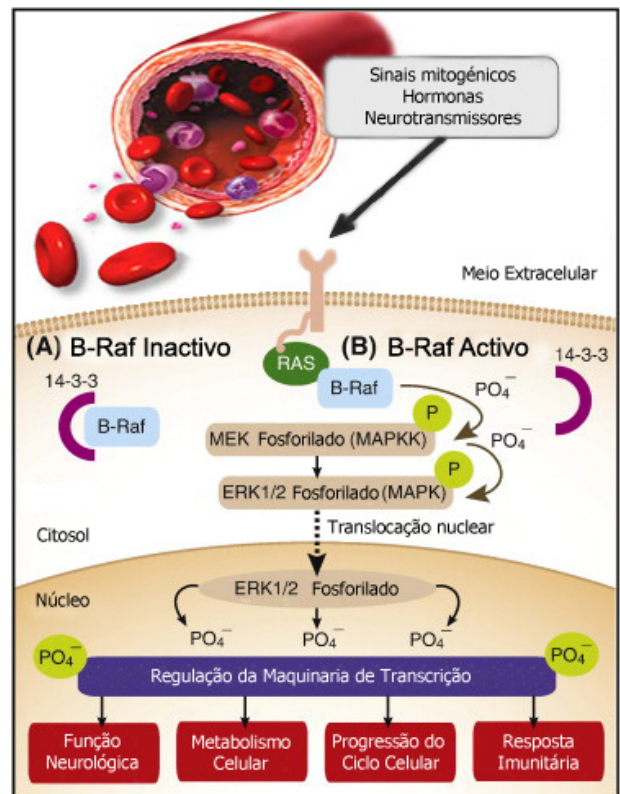


Fig. 1- Representação esquemática da via de sinalização MAPK. A sinalização começa no receptor TK, na membrana celular, após estimulação por sinais mitogénicos extracelulares (e.g. factores de crescimento). Quando activado após ligação ao GTP, a proteína RAS interage com a cínase da proteína RAF activando-a, 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

translocada para dentro do núcleo, onde regula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celulares^{2,10,14,19-21}.

As alterações moleculares encontradas nos carcinomas papilares podem ocorrer a diferentes níveis, como resultado de rearranjo dos genes *RET* e *NTRK1* (codificam o receptores tirosina-cínase), de mutações dos genes que codificam dois efectores intracelulares da via da MAPK

(uma proteína RAS de ligação ao GTP e uma cínase de serina-treonina BRAF), ou da translocação equilibrada do *PAX8-PPAR γ* ^{2,10,14,19-21}.

As mutações ou rearranjos de qualquer um destes genes podem ser encontrados 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

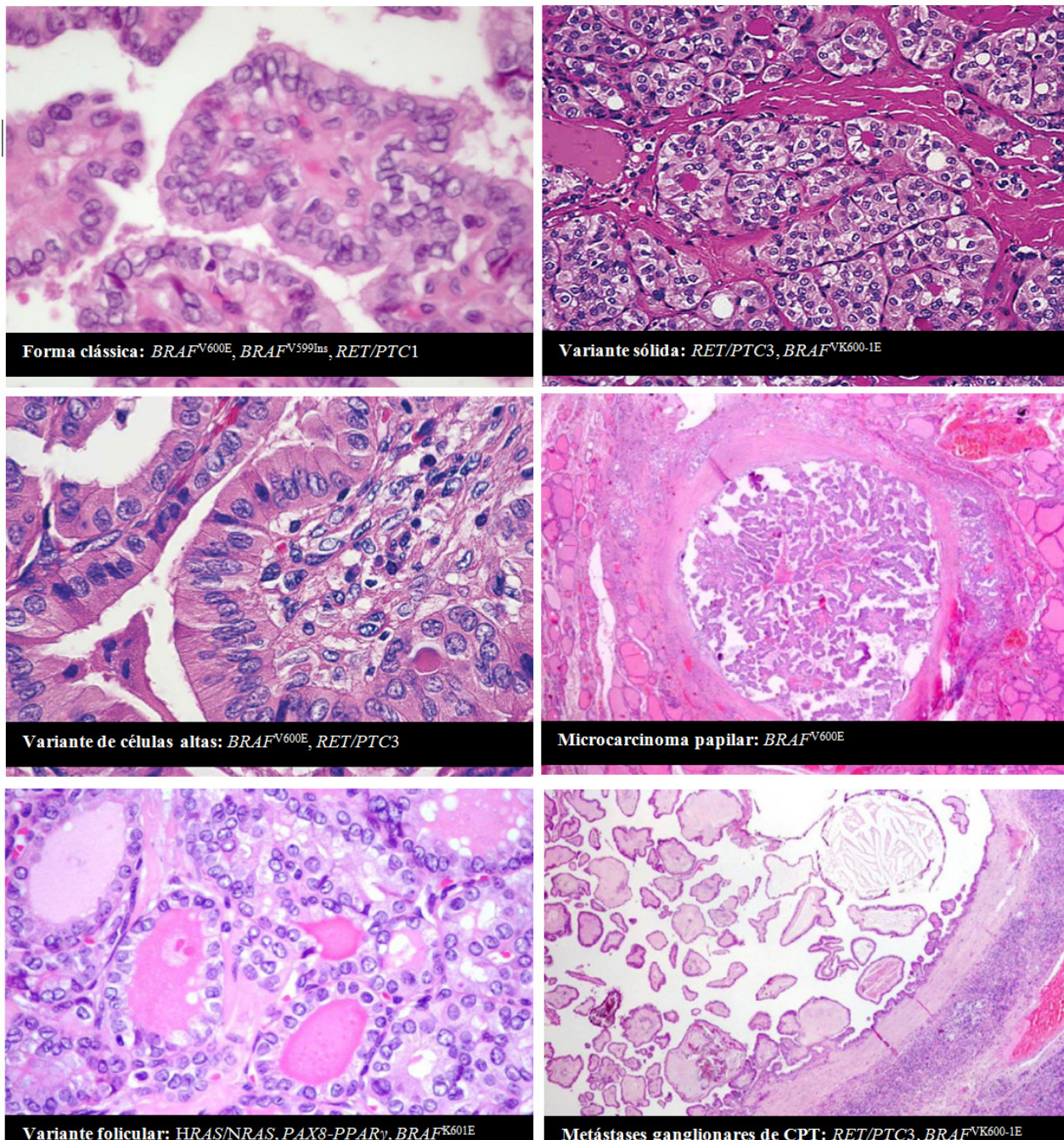


Fig. 2 - Associação de determinadas alterações genéticas, com certos fenótipos de CPT.

para a iniciação tumoral, mas que a alteração de um único efector da mesma é suficiente para a transformação celular neoplásica^{2,19-21}.

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, que culmina na activação da ciclina D1 e na proliferação celular^{10,20,22,23}.

A proteína *BRAF* pertence à família das cínases de serina-treonina RAF, tendo sido descritas três 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^{24,25}. Expressa-se em níveis elevados em células neuronais, hematopoiéticas e no testículo, e é igualmente a isoforma predominante nas células foliculares da tireóide^{2,4,26,27}.

Estudos *in vitro*, com modelos de células tireoideais benignas, evidenciaram inicialmente um papel particularmente importante para o *BRAF*, como um regulador central da diferenciação e da capacidade proliferativa^{2,28}. 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 VEGF²⁹.

As mutações activantes do *BRAF* foram já descritas em diversas neoplasias humanas, nomeadamente, e com maior prevalência, no melanoma (63-66%), mas também no carcinoma seroso do ovário (33-40%) e ainda no carcinoma colo-rectal (11-20%)^{3,10,22}.

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^{2,5,22,23,30-33}. Esta mutação, antes designada na literatura de V599E, foi corrigida em um codão em trabalhos mais actuais³³⁻³⁵.

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+FGFAT601-605ins}, 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^{2,23,31,32,36-42}.

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^{10,26,43}. A mutação *BRAF* afigura-se como uma alteração genética somática^{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%; Quadro 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; Quadro 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%)^{2,42,44-47}. Podemos encontrá-la, embora com menor frequência, 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.^{35,47-49} É de salientar, portanto, a exclusividade anteriormente referida, chamando-se a atenção para o facto da mutação *BRAF* ocorrer com baixa frequência na variante folicular do CPT (com prevalência média de 11%; Quadro 1) e não ocorrer no carcinoma folicular ou noutras neoplasias tireoideais²⁵.

Em oposição aos carcinomas papilares dos adultos, os tumores pediátricos (esporádicos ou aqueles induzidos pela radiação), têm baixa prevalência de mutações *BRAF* (0-12%)^{33,50-52}.

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 dá resultante, apresenta uma elevada actividade cinásica⁵³. 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^{31,33}. Esta revisão sistemática está focada na mutação *BRAF*^{V600E} e, portanto, o termo *BRAF* mutado aplicar-se-á referindo-se, sempre, à mutação supramencionada.

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^{3,14,53}.

As mutações *BRAF* não se encontram distribuídas de forma aleatória pelas variantes morfológicas do carcinoma papilar (Figura 2).

O *BRAF*^{V600E}, que é a mutação mais prevalente neste tipo de neoplasias, está sobretudo presente em casos de carcinomas com arquitetura 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 arquitetura 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} (Quadro 1)^{3,25,53}.

O *BRAF*^{K601E}, por sua vez, foi associado exclusivamente à variante folicular de CPT, estando presente em 7-9% dos casos^{36,42}. 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 três casos de CPT. Por fim, encontrou-se associação entre a *BRAF*^{V599Ins} e a forma clássica^{3,25}.

No entanto, para além destas mutações, outras alterações que envolvem genes já referidos estão presentes nestas neoplasias e serão importantes na determinação do fenótipo.

As translocações que envolvem o proto-oncogene *RET* são um desses casos, sendo que o rearranjo *RET/PTC1* está relacionado com casos de CPT com histotipo clássico^{54,55}, ao passo que o rearranjo génico *RET/PTC3* se associa frequentemente com a variante sólida (sobretudo no contexto pós-Chernobyl)^{56,57}, mas também com a variante de células altas⁵⁸. Já as mutações do RAS (sobretudo no codão 61 do *NRAS* e *HRAS*) são particularmente frequentes nos casos de variante folicular do CPT (25-100%)^{10,37,59,60}. Da mesma forma, constatou-se uma frequência aumentada de rearranjos *PAX8-PPARγ* (37,5%) em casos da variante folicular de CPT^{3,53}.

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.

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%^{16,61}. 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 histológico⁶¹.

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 citológico⁹.

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.⁶²⁻⁶⁹ 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^{62,66,67,70}.

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 variante morfológica 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*^{3,25,33}.

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^{63,66}. 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%⁶²⁻⁶. 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 maligna¹⁵.

Sabe-se que aproximadamente metade de todos os CPT não apresentam a mutação *BRAF* (Quadro 1), e esse valor aumenta se nos focarmos na citologia aspirativa indeterminada, que envolve habitualmente carcinomas fo-

liculares 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 prospectivo⁷¹ 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 nove 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 indeterminada⁷¹.

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/histológicos⁵³.

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 letal¹⁵. 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, sobretudo, a distância.⁷²⁻⁷⁶

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 VFCPT⁷⁷.

Cada um destes factores de risco clínico-patológicos parece estar associado com um aumento do risco de progressão, recidiva e, inclusive, morbidade e mortalidade

associadas ao cancro da tireóide, porém não são inteiramente seguros a predizer essas condições¹³.

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)^{74,78}. Tal facto explica a expressiva aposta na investigação de novos marcadores genéticos que possam influenciar os resultados a esse nível³. 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^{36,47,59,79-82}, maior incidência no género masculino^{83,84}, a presença de extensão extra-tireoideia^{47,59,70,85-95}, metástases ganglionares^{70,81,85,88,89,91-99} ou à distância^{48,79} e recidiva tumoral^{79,83,85,86,99}. Contudo, outros não encontraram evidência suficiente para apoiar essas correlações (Quadro 2).

A associação entre a idade e o género do doente com a mutação *BRAF* tem sido alvo de controvérsia considerável. Nikiforova et al, 2003⁴⁷ 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, 2003⁸⁴, 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, 2006¹⁰⁰, constataram que os CPT com *BRAF* mutado, eram de maiores dimensões, ($P=0,01$), em oposição ao estudo de Xing et al, 2005⁸⁵, 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 estudo¹⁷.

Lee et al¹³, 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:

Quadro 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
2	21/56 (38)	-	-	-	Xu, 2003
3	23/50 (46)	-	-	-	Soares, 2003
4	49/170 (29)	-	-	-	Namba, 2003
5	40/76 (53)	-	-	-	Fukushima, 2003
6	45/119 (38)	28/53 (53)	6/6 (100)	2/30 (7)	Nikiforova, 2003
7	45/124 (36)	28/53 (53)	1/3 (33)	0/32 (0)	Trovisco, 2004
8	36/95 (38)	28/42 (67)	-	6/51 (12)	Cohen, 2004
9	24/60 (40)	19/35 (54)	-	-	Puxeddu, 2004
10	8/16 (50)	-	-	-	Xing, 2004a
11	30/82 (37)	-	-	-	Nikiforova, 2004
12	18/56 (32)	18/47 (38)	-	0/6 (0)	Fugazzola, 2004
13	19/60 (32)	-	11/14 (79)	-	Frattini, 2004
14	26/69 (38)	16/35 (45)	5/9 (55)	3/22 (14)	Salvatore, 2004
15	58/70 (83)	-	-	-	Kim, 2004
16	37/72 (51)	-	-	-	Hayashida, 2004
17	7/15 (47)	-	-	-	Perren, 2004
18	4/12 (33)	-	-	-	Domingues, 2005
19	18/32 (58)	12/17 (71)	-	6/12 (50)	Powell, 2005
20	5/13 (38)	5/8 (62)	-	0/5(0)	Oler, 2005
21	38/61 (62)	36/52 (69)	-	2/9 (22)	Porra, 2005
22	55/176 (31)	33/72 (46)	-	4/54 (7)	Trovisco, 2005a
23	-	50/65 (77)	-	-	Rosenbaum, 2005
24	68/79 (86)	-	-	-	Kim, 2005a
25	-	21/33 (64)	-	-	Vasko, 2005
26	25/41 (61)	-	-	-	Giordano, 2005
27	-	31/60 (52)	-	-	Kim, 2005b
28	107/219 (49)	81/125 (65)	14/16 (88)	11/77 (14)	Xing, 2005
29	49/105 (47)	33/63 (52)	9/14 (64)	2/8 (25)	Liu, 2005
30	24/43 (56)	-	-	-	Carta, 2006
31	19/43 (44)	14/31 (45)	-	5/12 (42)	Sapio, 2006
32	40/96 (42)	30/53 (57)	6/6 (100)	2/30 (7)	Adeniram, 2006
33	28/67 (42)	18/35 (51)	4/5 (80)	5/25 (20)	Riesco-Eizaguirre, 2006
34	58/100 (58)	51/82 (62)	-	3/6 (50)	Lee, 2006
35	-	15/20 (75)	-	1/12 (8)	Di Cristofaro, 2006a
36	16/25 (64)	-	-	-	Matsukuma, 2006
37	102/161 (63)	-	-	-	Jo, 2006
38	31/58 (54)	29/45 (64)	-	2/13 (15)	Jin, 2006
39	-	149/203 (73)	-	-	Kim, 2006a
40	4/28 (14)	3/12 (25)	1/3 (33)	0/13 (0)	Sargent, 2006
41	52/61 (87)	25/30 (83)	4/4 (100)	1/3 (33)	Park, 2006
42	34/103 (33)	-	-	-	Kim, 2006b
43	-	28/42 (67)	-	-	Zuo, 2007
44	24/40 (55)	-	-	-	Abrosimov, 2007
45	38/64 (59)	38/61 (62)	-	0/3 (0)	Takahashi, 2007
46	41/91 (45)	17/35 (49)	14/21 (67)	9/35 (26)	Ugolini, 2007
47	5/11 (45)	-	-	-	Erickson, 2007
48	56/93 (60)	48/66 (73)	-	7/18 (39)	Durante, 2007
49	12/25 (48)	-	-	-	Brzezianska, 2007
50	31/50 (62)	10/18 (56)	12/15 (80)	9/17 (53)	Giannini, 2007
51	12/24 (50)	-	-	3/9 (33)	Hay, 2007
52	26/40 (65)	-	-	-	Nakayama, 2007
53	133/274 (49)	126/245 (51)	-	7/29 (24)	Kebebew, 2007
54	88/214 (41)	-	-	-	Rodolico, 2007
55	7/17 (41)	-	-	-	Rodrigues, 2007
56	11/16 (69)	8/11 (73)	2/3 (67)	1/2 (50)	Pizzolanti, 2007
57	214/500 (43)	56/82 (68)	32/40 (80)	21/112 (19)	Lupi, 2007
58	15/55 (27)	-	-	-	Goutas, 2008
59	54/108 (50)	45/94 (48)	8/11 (73)	1/3 (33)	Wang, 2008a
60	125/323 (39)	116/223 (52)	9/34 (26)	0/52 (0)	Frasca, 2008
61	27/49 (55)	13/16 (81)	-	6/17 (35)	Costa, 2008
62	11/58 (19)	-	-	-	Wang, 2008b
63	40/83 (48)	38/74 (51)	0/1 (0)	1/3 (33)	Barzon, 2008
64	38/102 (37)	-	-	-	Elisei, 2008
65	17/35 (49)	15/26 (58)	-	1/7 (14)	Trovisco, 2008
66	30/40 (75)	-	-	-	Jo, 2009
67	42/54 (78)	41/52 (79)	0/1 (0)	1/1 (100)	Henderson, 2009
68	88/101 (87)	-	-	-	Kim, 2009
69	24/64 (38)	-	2/4 (50)	-	Lee, 2009
70	242/631 (38)	230/583 (39)	6/12 (50)	4/20 (20)	Ito, 2009
71	58/120 (48)	48/73 (66)	-	10/47 (21)	Oler, 2009
72	20/49 (41)	20/43 (47)	-	0/6 (0)	Baitei, 2009
73	639/1032 (62)	-	-	-	Guan, 2009
74	153/230 (67)	-	-	16/613 (3)	Park, 2009
75	-	-	-	3/30 (10)	Santarpia, 2009
76	5/14 (36)	-	-	-	Chuang, 2009
77	48/74 (64)	(85)	-	(13)	Zatelli, 2009
78	-	123/311 (40)	-	-	Pellegriti, 2009
79	99/199 (50)	22/33 (67)	30/36 (83)	7/58 (12)	Yip, 2009
80	81/242 (33)	26/56 (46)	-	7/53 (13)	Sykorova, 2009
Total	3844/7890 (49)	1841/3415 (54)	176/258 (68)	169/1555 (11)	

(1) histotipo, sobretudo a variante de células altas (OR 4,319; 95% IC:1,970-9,469; $P=0,000$), mas também com a forma clássica (OR 3,521; 95% IC:2,506-4,948; $P=0,000$) e uma associação negativa 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 forma clássica, do que com outros histotipos, favorecendo o tipo não folicular; (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 no limiar da significância estatística. 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 publicada no mesmo ano, Xing¹⁴ corrobora, 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 metastizadas². Estes estudos apoiam os dados compilados nos Quadros 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^{47,86,97,99-106}, 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^{48,79} que observaram essa questão, encontraram uma fraca associação, embora estatisticamente significativa ($P=0,033$ e $P=0,045$, respectivamente), (Quadro 2).

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.*, 2005⁸⁵, num período de *follow-up* médio de 15 meses, no qual foi analisada retrospectivamente a recidiva tumoral em CPT primários, constatou-se uma associação positiva 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.*, 2007⁷⁹, 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 positiva 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.*, 2006⁸⁶, com um período de *follow-up* de 36 meses, ($P=0,02$). Num estudo muito recente, Sykorova *et al.*, 2009⁹⁹, 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. Mais uma vez a metanálise de Xing, 2007¹⁴ vem de encontro aos dados obtidos (*vide* Quadro 2), demonstrando a existência de associação positiva entre a mutação *BRAF* e a recidiva tumoral (OR 2,650; 95% IC:1,77-3,96; $P<0,001$).

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 prever, 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 tumoral³⁵.

No entanto, todos estes estudos referentes ao valor prognóstico da mutação *BRAF* apresentam algumas limitações, que se traduzem desde logo, pelo facto das associações estudadas ocorrerem com factores de mau prognóstico ou recidiva e não com o *outcome* final mais importante, a mortalidade.

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^{2,12,25}.

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*

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

Estudo no.	Invasão extra-tiroideia			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
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
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
4	10/22 (45)	10/29 (34)	0,655	8/23 (35)	16/33 (48)	0,328	-	-	-	-	-	-	Puxeddu, 2004
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
6	7/19 (37)	16/39 (41)	-	5/13 (38)	8/15 (53)	-	-	-	-	-	-	-	Salvatore, 2004
7	28/58 (48)	7/12 (58)	0,795	39/58 (67)	4/12 (33)	0,048	-	-	-	-	-	-	Kim, 2004
8	7/21 (33)	10/53 (19)	0,182	11/21 (52)	18/53 (34)	0,143	-	-	-	-	-	-	Trovisco, 2005a
9	33/64 (52)	8/15 (53)	0,947	24/64 (38)	7/15 (47)	0,513	-	-	-	-	-	-	Kim, 2005a
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, 2005b
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
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
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
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
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-Eizaguirre, 2006
16	32/58 (55)	14/42 (33)	0,031	14/58 (24)	10/42 (24)	0,970	-	-	-	-	-	-	Lee, 2006
17	8/31 (26)	2/27 (7)	0,087	15/31 (48)	7/27 (26)	0,106	-	-	-	-	-	-	Jin, 2006 †
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
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, 2006a
20	34/53 (64)	5/8 (63)	0,928	21/53 (40)	2/8 (25)	0,426	-	-	-	-	-	-	Park, 2006
21	8/9 (89)	30/94 (32)	<0,0001	26/34 (76)	12/69 (17)	<0,0001	-	-	-	-	-	-	Kim, 2006b
22	7/28 (25)	3/14 (21)	>0,9999	19/28 (68)	10/14 (71)	>0,9999	-	-	-	-	-	-	Zuo, 2007
23	12/24 (50)	7/20 (35)	0,37	10/24 (42)	11/20 (55)	0,22	-	-	-	-	-	-	Abrsimov, 2007
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
25	24/111 (22)	20/98 (20)	0,7957	53/111 (48)	32/98 (33)	0,0323	-	-	-	38/111 (34)	18/98 (18)	0,009	Kebebew, 2007 †
26	-	-	-	23/88 (26)	19/126 (15)	0,034	-	-	-	-	-	-	Rodolico, 2007
27	-	-	-	2/11 (18)	1/5 (20)	-	-	-	-	-	-	-	Pizzolami, 2007
28	82/214 (38)	47/286 (16)	<0,0001	34/214 (16)	19/286 (7)	0,0009	-	-	-	-	-	-	Lupi, 2007
29	-	-	-	2/15 (13)	8/40 (20)	0,710	-	-	-	-	-	-	Goutas, 2008
30	30/54 (56)	18/54 (33)	0,02	18/54 (33)	16/54 (30)	0,67	-	-	-	-	-	-	Wang, 2008a
31	51/125 (41)	36/198 (18)	<0,0001	40/125 (32)	27/198 (14)	0,0001	-	-	-	-	-	-	Frasca, 2008
32	-	-	-	-	-	0,083	-	-	-	-	-	-	Costa, 2008
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
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

Quadro 2 - Correlação da mutação BRAF^{V600E} com características clínico-patológicas convencionais do CPT (continuação)

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 *	
	35	18/34 (53)	4/9 (44)	-	26/36 (72)	3/11 (27)	-	1/42 (2)	0/12 (0)	-	-	-	
36	12/24 (50)	4/40 (10)	0,001	12/40 (50)	6/40 (15)	0,003	-	-	-	-	-	-	Lee, 2009
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
38	26/54 (48)	14/60 (23)	0,0056	35/58 (60)	16/62 (26)	0,0001	-	-	-	-	-	-	Oler, 2009
39	-	-	-	22/24 (92)	10/19 (53)	<0,01	-	-	-	-	-	-	Baitei, 2009
40	77/515 (15)	22/284 (8)	0,003	198/515 (38)	81/284 (29)	0,005	-	-	-	-	-	-	Guan, 2009
41	2/3 (67)	3/11 (27)	-	2/3 (67)	5/11 (45)	-	1/3 (33)	0/11 (0)	-	-	-	-	Chuang, 2009
42	(44)	(31)	>0,05	(35)	(37)	>0,05	-	-	-	-	-	-	Zatelli, 2009
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
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
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

mais apertado e, eventualmente, o uso de modalidades de imagem como a PET, para pesquisar persistência/recidiva tumoral¹².

ABREVIATURAS

AKAP9, A kinase (PRKA) 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; GDP, guanosine 5'-diphosphate; GTP, guanosine-5'-triphosphate; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCP, microcarcinoma papilar; MEK 1/2, MAPK/ERK kinase 1 and 2; MMP12, matrix metalloproteinase 12; NTRK1, neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1; PAX8, paired box gene 8; PET, positron emission tomography; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; RAS, rat sarcoma viral oncogene; RET, rearranged during transfection; SNC, sistema nervoso central; TK, tyrosine kinase; VCACPT, variante de células altas do carcinoma papilar da tireóide; VEGF, vascular endothelial growth factor; VFCPT, variante folicular do carcinoma papilar da tireóide.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fátima Carneiro e Ana Paula Soares a revisão crítica deste trabalho e incentivo à sua publicação.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

REFERÊNCIAS

1. CIAMPIR, NIKIFOROV YE: RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007;148:936-941
2. TANG KT, LEE CH: BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *J Chin Med Assoc* 2010;73:113-128
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;51:643-653
4. FAGIN JA, MITSIADES N: Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:955-969
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;1795:152-161
6. DAVIES L, WELCH HG: Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006;295:2164-7
7. KUMAR V, ABBASA, FAUSTO N: Robbins & Cotran - Pathologic Basis of Disease. In: Elsevier, ed. 7ª 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, CZARNIECKAA, 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;51:736-747
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;28:742-762
15. PUXEDDU E, DURANTE C, AVENIAN, FILETTI S, RUSSO D: Clinical implications of BRAF mutation in thyroid carcinoma. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:138-145
16. AL-BRAHIM N, ASA SL: Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1057-62
17. 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
18. ROBINSON MJ, COBB MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180-6
19. 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;23:7436-440
20. 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
21. 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
22. DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, et al.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-954
23. 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;116:855-867
24. MERCER KE, PRITCHARD CA: Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653:25-40
25. 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
26. GARNETT MJ, MARAIS R: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Nature Cell* 2004;6:313-9
27. FAGIN JA: How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol* 2004;183:249-256
28. ESPINOSA AV, PORCHIALI, RINGEL MD: Targeting BRAF in thyroid cancer. *Br J Cancer* 2007;96:16-20
29. SALEHIAN B, LIU Z: Genetic alterations in differentiated thyroid cancers. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009;9:257-268
30. HUBBARD SR: Oncogenic mutations in B-Raf: some losses yield gains. *Cell* 2004;116:764-6
31. 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
32. 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
33. CIAMPI R, NIKIFOROV YE: Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005;16:163-172
34. FUSCO A, VIGLIETTO G, SANTORO M: A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. *J Clin Invest* 2005;115:20-3
35. XING M: BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:245-262
36. 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(a);446:589-595
37. CASTRO P, REBOCHO AP, SOARES RJ et al: PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:213-220
38. 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;62:509-511
39. 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
40. CARTA C, MORETTI S, PASSERIL 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
41. 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
42. 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;202:247-251
43. 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
44. 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(b);63:588-593
45. SEDLIAROU I, SAENKO V, LANTSOV D et al: The BRAF T1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *Int J Oncol* 2004;25:1729-35
46. 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
47. 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
48. 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
49. XING M, VASKO V, TALLINI G et al: BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1365-8
50. KUMAGAI A, NAMBA H, SAENKO VA et al: Low frequency of BRAF T1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4280-4
51. 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
52. 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
53. HUNT J: Understanding the genotype of follicular thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2005;16:311-321
54. 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
55. 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;4:287-294
56. 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
57. NIKIFOROV YE: RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 2002;13:3-16
58. BASOLO F, GIANNINI R, MONACO C et al: Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:247-254

59. 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;30:216-222
60. 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;37:824-830
61. FILETTI S, DURANTE C, TORLONTANO M: Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:384-394
62. CHUNG KW, YANG SK, LEE GK et al: Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cytopathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:660-6
63. 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
64. 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
65. 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
66. ROWE LR, BENTZ BG, BENTZ JS: Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal* 2006;3:10
67. 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
68. SAPIO 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;66:678-683
69. XING M, TUFANO RP, TUFANO 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(a);89:2867-72
70. JIN L, SEBO TJ, NAKAMURA N et al: BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:136-143
71. NIKIFOROV YE, STEWARD DL, NIKIFOROV MN et al: Role of molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration (FNA) diagnosis of thyroid nodules (Proceedings of the 77th Annual Meeting of The American Thyroid Association) [abstract]. *Thyroid* 2006;16:922
72. MAZZAFERRI EL, JHIANG SM: Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994;97:418-428
73. DEGROOT LJ, KAPLAN EL, MCCORMICK M, STRAUSFH: Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:414-424
74. 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
75. 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
76. 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
77. 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
78. MAZZAFERRI EL: Managing small thyroid cancers. *JAMA* 2006;295:2179-82
79. KEBEBEWE 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
80. 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(a);55:540-5
81. RODOLICO V, CABIBID, PIZZOLANTI G et al: BRAF V600E mutation and p27 kip1 expression in papillary carcinomas of the thyroid $\leq 1\text{ cm}$ and their paired lymph node metastases. *Cancer* 2007;110:1218-26
82. 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;205:558-564
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(a);65:364-8
84. 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
85. 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
86. 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;13:257-269
87. 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
88. KIM J, GIULIANO AE, TURNER RR et al: Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 2006(b);244:799-804
89. 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
90. 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(a);15:183-190
91. 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
92. 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
93. 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;115:972-980
94. 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
95. YIP L, NIKIFOROVA MN, CARTY SE et al: Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation. *Surgery* 2009;146:1215-23
96. 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;45:818-821
97. SAPIO MR, POSCAD, 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
98. BAITTEI 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;217:707-715
99. SYKOROVA V, DVORAKOVA S, RYSKAA A et al: BRAFV600E Mutation in the Pathogenesis of a Large Series of Papillary Thyroid Carcinoma in Czech Republic. *J Endocrinol Invest* 2009

100. JOYS, 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
101. 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
102. 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
103. 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;68:618-634
104. 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
105. 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
106. 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
107. FUKUSHIMA T, SUZUKI S, MASHIKO M et al: BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 2003;22:6455-7
108. 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
109. FUGAZZOLA L, MANNAVOLA D, CIRELLO V et al: BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:239-243
110. PERRENA 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;11:855-860
111. DOMINGUES R, MENDONÇA 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
112. 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
113. 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
114. 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
115. 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
116. 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(a);13:485-495
117. MATSUKUMA S, YOSHIHARAM, KASAI F et al: Rapid and simple detection of hot spot mutations of epidermal growth factor receptor, BRAF, and NRAS in cancers using the loop-hybrid mobility shift assay. *J Mol Diagn* 2006;8:504-512
118. 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;17:235-241
119. 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
120. 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
121. 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
122. 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
123. ERICKSON LA, JIN L, NAKAMURAN, 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
124. BRZEZIANSKA E, PASTUSZAK-LEWANDOSKA D, WOJCIECHOWSKA K et al: Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Neuro Endocrinol Lett* 2007;28:351-9
125. 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
126. 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
127. 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
128. 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;18:917-926
129. 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
130. 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(b);263:44-52
131. 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
132. JOYS, 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;70:139-144
133. 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;15:485-491
134. 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;19:137-141
135. SANTARPIA L, SHERMAN SI, MARABOTTI A, CLAYMAN GL, EL-NAGGARAK: Detection and molecular characterization of a novel BRAF activated domain mutation in follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:827-833
136. 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
137. 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;161:467-473
138. 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