

Marcello, M.A.¹; Araújo, P.P.C.^{1,2}; Morari, E.C.¹; Guilhen, A.C.T.¹; Bufalo, N.E.¹; Tincani, A.J.²; Assumpção, L.V.M.³; Ward, L.S.¹.

¹Laboratório de Genética Molecular do Câncer, FCM, ²Centro Médico Campinas, ³Endocrinologia, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

marjoryam@gmail.com

INTRODUÇÃO

Embora a mutação hot spot V600E do gene BRAF seja reconhecida como a mais freqüente anormalidade molecular somática no CP, influenciando não apenas seu diagnóstico, mas também auxiliando na caracterização da agressividade tumoral e do prognóstico dos pacientes, ainda faltam estudos sobre a importância da expressão deste gene, importante elemento da principal via de sinalização envolvida na etiopatogenia do CP, a via da MAPK. A mutação V600E tem sido identificada em DNA de células cancerígenas circulantes e relacionada com maior agressividade tumoral e pior prognóstico dos pacientes. Uma série de genes específicos da tireoide também têm sido identificados em células tireoidianas circulantes, como o gene de tireoglobulina e, mais recentemente, mRNA de TSH.. Esta identificação apresenta vantagens sobre as técnicas baseadas em tecido, constituindo-se num potencial marcador de evolução e de prognóstico.

OBJETIVOS

Investigar a possibilidade de detectarmos a presença da mutação T1799A de BRAF em células tireoidianas circulantes de CP

Comparar a expressão de BRAF quantificado por real-time PCR com variáveis clínico-patológicas (sexo; idade; antecedentes pessoais e de exposição ambiental incluindo fumo; tamanho e características ultrasonográficas US; citologia) e laboratoriais (Tg e anticorpos antitireoide-AcTg) coletadas no período pré operatório, com aspectos referentes ao peri-operatório (tipo de cirurgia; achados cirúrgicos; histologia e expressão proteica por imunohistoquímica); achados pós-operatórios (PCI, US e outras imagens, Tg e AcTg) e a evolução e sobrevida de um grupo de pacientes com CP operados e seguidos por uma mesma equipe de acordo com um mesmo protocolo.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Extraímos DNA do sangue periférico de 100 pacientes em diferentes estágios da doença. Vinte destes indivíduos apresentavam metástases a distância no momento da coleta tendo sido obtido tecido tumoral concomitante em 4 pacientes. A mutação foi analisada através da técnica de PCR-RFLP (Figuras 1 e 2) e a amplificação foi confirmada através de seqüenciamento direto de 2 casos.

Foram coletados tecidos tireoideano normal e tumoral de 173 pacientes, sendo 63 CPs (6 homens e 57 mulheres) seguidos por 5 a 56 meses ($21,4 \pm 12,45$ meses). 45 eram papilíferos clássicos, 11 variantes foliculares e 7 representavam outras variantes; 18 eram microcarcinomas, 9 tinham 1 a 2 cm e apenas 1 era maior que 4 cm, os restantes tendo 2 a 4 cm. 42 pertenciam ao estágio TNM 1, 10 ao estágio 2, 9 ao estágio 3 e 2 ao estágio 4. A quantificação de RNAm realizada pela técnica de PCR real-time de BRAF (Figura 3) foi realizada em 51 casos e os valores de RQ (Tabela 1) foram classificados dos 1 a 10 Unidades Arbitrárias (UA). Classificamos os casos com expressão de BRAF em grupos A (hipoexpressão) (1 a 5 UA), B (5 a 10 UA) e C (hiperexpressão) (>10 UA). A média de idade foi de $47 \pm 13,9$ anos. A sobrevida global foi de 83,3% em 48 meses.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 100 pacientes apresentaram resultados de restrição condizentes com o padrão selvagem do gene BRAF (uma banda de 124 pb, uma de 87 pb e outra de 13 pb) no material obtido de sangue periférico. Entre os 4 tumores analisados, encontramos um mutante heterozigoto (bandas de 211 pb, 124 pb, 87 pb e 13pb) para T1799A. Estes dados preliminares sugerem que a detecção da mutação T1799A do gene BRAF em sangue periférico de pacientes portadores de CP é possível, embora ainda não tenhamos encontrado nenhum portador da mutação. Apesar de 12 dos 100 pacientes investigados apresentarem níveis elevados de tireoglobulina circulante no momento da coleta, indicando a presença de células tireoidianas funcionais, estas células poderiam ser não-tumorais ou não detentoras da mutação de BRAF.

Análise de regressão logística multivariada identificou o tabagismo ($p < 0,0001$), a presença de linfonodos clinicamente suspeitos ao diagnóstico ($p = 0,035$), o tipo de cirurgia realizado ($p = 0,03$) e a ocorrência de complicações pós operatórias ($p = 0,02$) como fatores que diminuíram a sobrevida global. A confirmação anátomo-patológica de linfonodos metastáticos no compartimento central também diminuiu a sobrevida global ($p = 0,0039$). A expressão do gene BRAF ($p = 0,01$), os critérios de agressividade histológicos ($p < 0,0001$), a presença de linfonodos positivos à patologia ($p = 0,045$) influenciaram negativamente, enquanto que a realização de radioiodoterapia ($p = 0,029$) influenciou favoravelmente o prognóstico. Quando isoladas, as variáveis sexo ($p = 0,01$), e tabagismo ($p < 0,0001$) foram relevantes para sobrevida global.

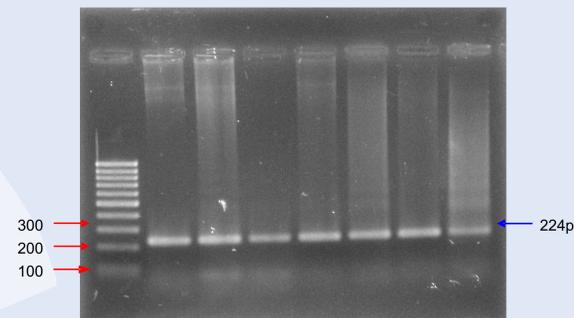


Figura 1. Gel da PCR do gene BRAF com fragmento de 224pb.

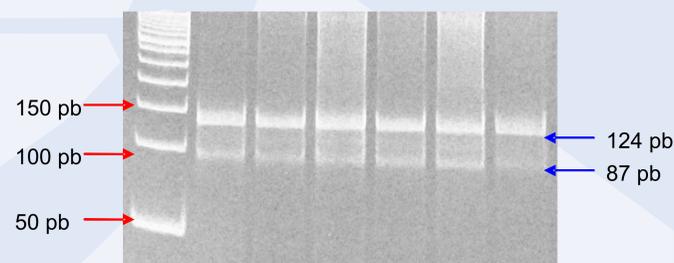


Figura 2. Gel da restrição do gene BRAF com pacientes de fenótipo selvagem (bandas de 124 pb, 87 pb e 13pb).

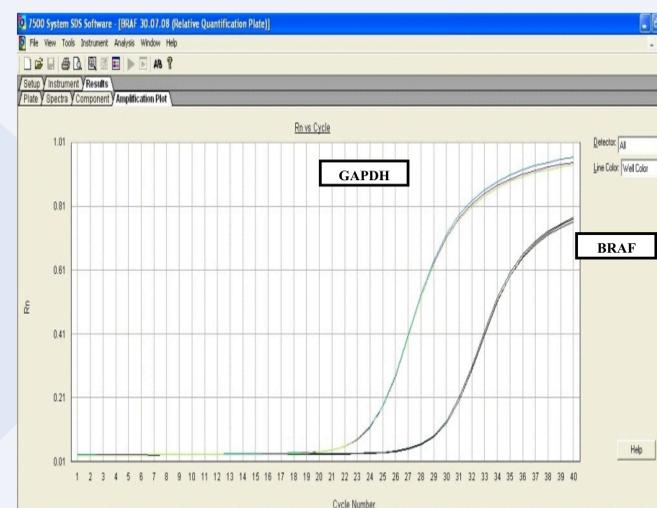


Figura 3. Tela da Quantificação Relativa por PCR Real Time com as curvas de amplificação do gene BRAF e do controle endógeno GAPDH

CONCLUSÕES

Concluimos que, além dos critérios clínicos, ultrasonográficos e histológicos classicamente utilizados na determinação de agressividade tumoral, a quantificação da expressão do gene BRAF é importante no sentido de se estratificar indivíduos de risco para pior evolução, contribuindo para a identificação dos casos que necessitam de tratamento mais agressivo.

Novos dados deverão esclarecer estes dados preliminares sobre a mutação de BRAF confirmando a possível utilidade do método no diagnóstico de casos mais agressivos e, talvez, na avaliação da presença de recidiva ou metástase em pacientes em seguimento por CP.